

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОРДЕНА ЛЕНИНА СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ

на правах рукописи

ГАНУСОВ ВИТАЛИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ
ПЛАЗМИД МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.00.02 - Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
с.н.с. Брильков А.В.

Красноярск - 2001

РЕФЕРАТ

В предложенной диссертации разработан новый теоретический подход к изучению закономерностей популяционной динамики штаммов микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды в условиях управляемого культивирования. Подход основан на математических моделях, описывающих динамику распределения численности бактериальных клеток, содержащих различное число копий плазмид, в популяции микроорганизмов. В результате теоретического анализа и экспериментальных исследований показано, что стабильность (длительность поддержания) плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов при периодическом и непрерывном культивировании определяется в значительной степени копийностью рекомбинантных плазмид в клетках-хозяевах и эффективностью экспрессии клонированных в плаزمиде генов.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 38 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 253 источника, из них 214 на иностранном языке. По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них 4 статьи в центральных журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ПОПУЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ УПРАВЛЯЕМОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ	9
1.1. Общие закономерности роста и развития популяций микроорганизмов при управляемом культивировании.	9
1.2. Нестабильность рекомбинантных штаммов микроорганизмов при управляемом культивировании.	17
1.3. Механизмы контроля копияности плазмид на примере плазмиды ColE1.	25
ГЛАВА 2. РАСПРЕДЕЛЕННЫЕ МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ ПЛАЗМИД	30
2.1. Точная математическая модель популяционной динамики многокопийных плазмид: формулировка и некоторые решения.	30
2.2. Приближенная математическая модель популяционной динамики многокопийных плазмид: анализ непрерывной модели.	43
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТА МНОГОКОПИЙНОСТИ ПЛАЗМИДЫ НА ПОПУЛЯЦИОННУЮ ДИНАМИКУ ПЛАЗМИДСОДЕРЖАЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ	67
3.1. Приближенная математическая модель популяционной динамики многокопийных плазмид: анализ дискретной модели (связь с точной моделью и динамика средних).	67
3.2. Приближенная математическая модель популяционной динамики многокопийных плазмид: анализ дискретной модели (стационарные распределения, оценка параметров модели и связанная с ними стабильность плазмид).	81
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНИРОВАННЫХ В ПЛАЗМИДЕ ГЕНОВ НА ПОПУЛЯЦИОННУЮ ДИНАМИКУ ПЛАЗМИД МИКРООРГАНИЗМОВ	96
4.1. Методы оценки параметров математической модели Стюарта-Левина (Stewart and Levin, 1977) в непрерывной культуре.	97

4.2. Экспериментальный и теоретический анализ связи экспрессии плазмидных генов и давления отбора, направленного против плаз- мидсодержащих клеток.	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	138
ЛИТЕРАТУРА	143

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. В последние годы все большее распространение в биологических науках получают количественные методы. Анализ математических моделей и предсказания, основанные на этих моделях, часто позволяют не только объяснить наблюдаемый феномен, но и предложить дальнейшие эксперименты для его более глубокого понимания. Изучение популяционной динамики плазмид микроорганизмов в различных условиях управляемого культивирования является важной теоретической и прикладной задачей по ряду причин. Прежде всего, многие природные плазмиды определяют устойчивость к различного рода антибиотикам (*R* плазмиды). Приобретение таких плазмид патогенными микроорганизмами приводит к многочисленным осложнениям у инфицированных пациентов при использовании традиционных методов лечения (с использованием антибиотиков). Понимание механизмов поддержания *R* плазмид в клетках-хозяевах в естественных и лабораторных условиях - это первый шаг к направленному снижению антибиотико-устойчивости среди природных плазмидсодержащих бактерий, а, следовательно, к увеличению эффективности лечения инфекционных заболеваний с помощью антибиотиков. В то же время плазмиды широко используются как векторы при конструировании рекомбинантных штаммов-продуцентов, которые в дальнейшем применяются в биотехнологическом производстве целого ряда различных биологических соединений, в том числе, аминокислот, ферментов, гормонов и др., с их помощью разрабатываются также вакцины против вирусных инфекций (например, ВИЧ). Исследование причин нестабильности рекомбинантных плазмид микроорганизмов необходимо для повышения продуктивности биотехнологических процессов. Настоящая работа посвящена изучению особенностей популяционной динамики плазмидсодержащих штаммов при учете наличия нескольких копий плазмиды в клетках микроорганизмов.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью настоящей работы является разработка теоретического подхода к изучению закономерностей популяционной динамики микроорганизмов, содержащих многокопийные рекомбинантные плазмиды, в различных условиях управляемого культивирования.

ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Разработать математическую модель динамики численности многокопийных плазмид в популяции бактериальных клеток при управляемом культивировании.
2. С помощью математической модели проанализировать особенности популяционной динамики нестабильных штаммов микроорганизмов, содержащих многокопийные рекомбинантные плазмиды, в различных условиях управляемого культивирования.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. В работе использовались методы математического моделирования динамики численности биологических популяций, построение и реализация детерминированных моделей в обычных и частных производных, конечно-разностные схемы для системы дифференциальных уравнений в частных производных, методы качественной теории дифференциальных уравнений, экспериментальные методы культивирования плазмидсодержащих микроорганизмов в периодической и непрерывной культуре.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.

1. Предложен новый теоретический подход, основанный на уравнении непрерывности, позволяющий описывать динамику численности многоплазмидных многокопийных штаммов микроорганизмов в различных условиях культивирования. На основании предложенного теоретического подхода, построены математические модели популяционной динамики многокопийных плазмид с учетом негативного контроля репликации плазмид (на примере плазмиды ColE1), кинетической и сегрегационной нестабильности рекомбинантных штаммов микроорганизмов.
2. Впервые теоретически объяснен эффект снижения селективного давления на популяцию многокопийного генноинженерного штамма, связанный со снижением среднего числа копий плазмид в клетках. Показано, что время полуэлиминации плазмид в популяции нестабильного рекомбинантного штамма в хемостате не зависит от максимального числа копий плазмиды в клетке, а определяется только средним временем генерации микробной популяции, скоростью потери плазмид клеткой и уровнем селективного давления на плазмидсодержащий штамм.
3. С помощью разработанных методов оценки параметров плазмидсодержащих бакте-

рий впервые показано, что нестабильность генноинженерных штаммов микроорганизмов при низких удельных скоростях разбавления среды в хеостате связана в основном с увеличением селективного преимущества популяции бесплазмидных клеток, при этом также отмечено увеличение сегрегационной стабильности плазмид при низких D .

4. В экспериментах с рекомбинантным штаммом *E. coli* MG1655, содержащим клонированный на плазмиде pGLO ген *gfp* (зеленого флуоресцирующего белка), показано, что селективное преимущество бесплазмидных клеток α , характеризующее популяционную стоимость плазмид, прямо пропорционально эффективности экспрессии гена *gfp*.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ. Результаты работы могут быть использованы для описания динамики генно-инженерных штаммов микроорганизмов, содержащих многокопийные плазмиды, используемых в биотехнологическом производстве. Предложенные в работе методы определения параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов могут быть взяты за основу для оценки нестабильности рекомбинантных бактерий. Методика проведения конкурентных экспериментов рекомбинантных штаммов с заданным уровнем экспрессии клонированных генов может быть использована для изучения влияния эффективности экспрессии клонированных генов на стабильность различных плазмид.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Результаты работы докладывались на VII Всероссийском симпозиуме “Коррекция гомеостаза” (Красноярск, 1996), на VIII Международном симпозиуме “Реконструкция гомеостаза” (Красноярск, 1998), на III Сибирском конгрессе по индустриальной и прикладной математике, посвященный памяти С.Л. Соболева (ИНПРИМ-98, Новосибирск, 1998), на семинарах лаборатории УБГ и теоретического отдела ИБФ СОРАН, на семинарах лаборатории проф. Б. Левина (Emory University, Atlanta, USA, 1999-2000).

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них 4 статьи в центральных журналах, 2 статьи в сборниках научных трудов, 15 тезисов докладов на конференциях, 1 статья принята к печати.

БЛАГОДАРНОСТИ. Автор благодарит Брилькова А.В. за постоянную помощь и великое терпение во время моего обучения и становления как полноценного исследователя, Печуркина Н.С. - за редкие, но меткие замечания, сотрудников лаборатории УБГ - за теп-

лую атмосферу и постоянную помощь, персонально R. Antia и B. Levin, и в частности Antia Lab (Veronique Perrot, Ming Zhang) и Levin Lab (Luba Beylina, Mary Reynolds, Andy Demma, Nina Walker и ряд других сотрудников) - за помощь в проведении экспериментов и многочисленные обсуждения результатов и критику, Victoria Finnerty - за предоставление флуориметра, и самое главное, кафедру биофизики и деканат физического факультета Красноярского госуниверситета, в особенности Холостову З.Г., Фишова В.В., Старикова П.А., Лопатина В.Н., Сорокина А.В. и многих других сотрудников и друзей - за многолетнюю помощь и поддержку в работе, учебе и научной деятельности, а также Президентскую программу для студентов и аспирантов российских вузов за поддержку моей стажировки в Университете Эмори (Атланта, США).

Г Л А В А 1

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ УПРАВЛЯЕМОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМ- БИНАНТНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1. Общие закономерности роста и развития популяций микроорганизмов при управ- ляемом культивировании

Одной из удивительных способностей живых организмов, практически не наблюдаемая в неорганическом мире, является способность к пролиферации или, другими словами, к последовательному делению. Бактерии, дрожжи, большинство клеток высших растений и животных делятся на протяжении всей жизни, замедляя и ускоряя свой рост в зависимости от внешних условий. Способность микроорганизмов, например бактерий, к быстрой пролиферации была плодотворно использована во многих направлениях современной биологии, в частности при изучении направлений эволюции в микробных популяциях при непрерывном культивировании (Dykhuizen, 1993; Hartl et al., 1985; Smith and Waltman, 1995; Weikert et al., 1997; Печуркин, 1978; Печуркин и др., 1990; Абросов и др., 1982) и в биотехнологии для производства различных полезных продуктов (Bailey et al., 1986; Бейли и Оллис, 1989; Баев, 1985; Баев и Быков, 1987). Как оказалось впоследствии, рост микроорганизмов в различных условиях культивирования может быть с достаточной легкостью описан простыми математическими моделями, которые во многих случаях не только количественно описывают процесс увеличения численности популяции микроорганизмов, но и предсказывают, какой из вариантов будет отобран в результате эволюционного процесса, например, в хемостате (Dykhuizen and Hartl, 1983; Pirt, 1975; Smith and Waltman, 1995; Абросов и др., 1982; Романовский и др., 1975).

Основным показателем биологической популяции является ее плотность, размер или численность популяции (Monod, 1949). Например, микробные популяции часто характеризуются числом клеток в единице объема (10^9 клеток/мл) либо оптической плотностью, измеренной на определенной длине волны (0.5 OD на 540 нм). Вторым и возможно наиболее важным показателем является скорость роста биологической популяции (Monod, 1949).

В условиях, благоприятных для развития популяции микроорганизмов, ее численность находится в постоянной динамике, которая складывается из прироста, отмирания, мутаций, поедания хищниками и т.п. Прирост численности популяции вследствие раз-

множения особей можно охарактеризовать *удельной скоростью размножения* (или роста) μ , которая определяется как отношение прироста численности популяции к ее численности N :

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}. \quad (1.1.1)$$

Для условий, в которых удельная скорость роста представляет постоянную величину (периодическая культура или турбидостат), прямым интегрированием мы находим изменение численности популяции со временем, подчиняющееся экспоненциальному закону:

$$N(t) = N(0)\exp(\mu t), \quad (1.1.2)$$

где $N(0)$ - численность популяции к моменту времени $t = 0$. Если предположить, что рост популяции происходит простым делением на две клетки (как, например бактерии) из простейшего уравнения $N(g) = N(0)2^g$, где g - число генераций, мы находим связь скорости роста популяции и средним временем генерации t_{gen} :

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_{gen}}. \quad (1.1.3)$$

Аналогичным способом можно также описать элиминацию особей (клеток) популяции в результате их гибели. Этот количественный способ описания динамики популяции на основе кинетических уравнений широко используется в исследованиях развития популяций самых различных организмов, начиная с простейших бактерий и заканчивая многоклеточными организмами (например, паразит *Plasmodium falciparum*, вызывающий малярию), в том числе и размножающихся половым путем (Anderson and May, 1991; Pirt, 1975). Рассмотрим основные примеры такого описания, используемые при моделировании динамики численности микроорганизмов при управляемом культивировании (Печуркин и др, 1990).

Периодическое культивирование. Периодическое культивирование обычно состоит из

помещения популяции микроорганизмов в свежую питательную среду, содержащую в избытке необходимые для роста субстраты. В процессе дальнейшего развития самых различных популяций динамика их численности описывает S-образную (логистическую) кривую, в общих чертах изображенную на рис. 1.1.1.

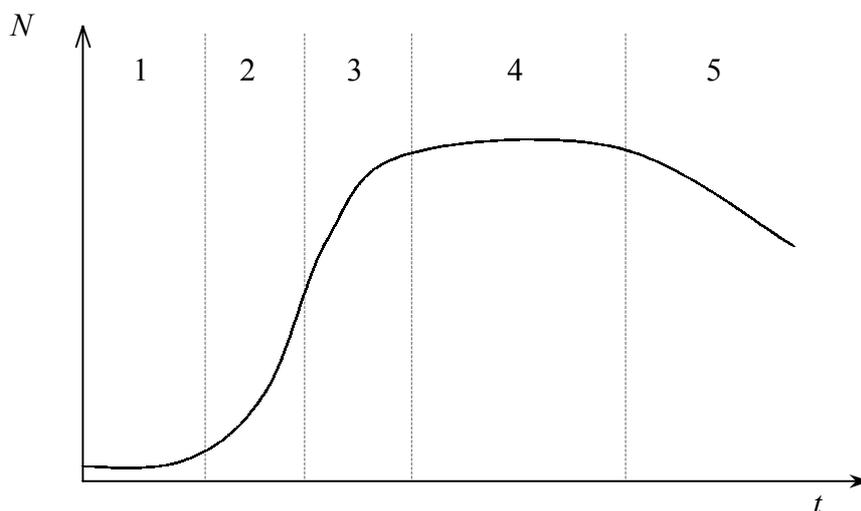


Рис. 1.1.1. Кривая и фазы роста популяции при периодическом культивировании. 1- лаг-фаза, 2- логарифмическая фаза, 3- фаза замедления, 4 - стационарная фаза, 5 - фаза отмирания (Monod, 1949).

Логистическая кривая роста микробных популяций в периодической культуре традиционно подразделяется на ряд последовательных фаз (Monod, 1949; Pirt, 1975; Печуркин, 1978; Печуркин и др., 1990): лаг-фаза, логарифмическая фаза (или фаза экспоненциального роста), фаза замедления, стационарная фаза и фаза отмирания (см. рис. 1.1.1). В лаг-фазе популяция подготавливается к размножению, ее численность не меняется. Обычно, в лаг-фазе происходит накопление в клетках микроорганизмов достаточного числа рибосом, способного обеспечить сбалансированный рост в новых условиях (Ehrenberg and Kurland, 1984; Neidhardt and Curtiss, 1996; Романовский и др., 1975; Волькенштейн, 1978). В логарифмической фазе численность популяции растет экспоненциально с постоянной скоростью μ_{\max} в соответствии с уравнением (1.1.2). Очевидно, что по зависимости $\ln N$ от времени можно с легкостью (графически либо используя линейную регрессию) определить максимальную скорость роста популяции μ_{\max} (Monod, 1949). В фазе замедления скорость роста популяции снижается, тогда как в последующей стационарной фазе находится на примерно постоянном уровне. Снижение скорости роста популяции микроорганизмов обычно связано с исчерпанием тех или иных субстратов, хотя возможно и прямое

ингибирование роста накопленными при росте продуктами метаболизма бактерий или изменение ионного состава среды (рН) (Monod, 1949). В фазе отмирания численность популяции снижается.

Логистическая кривая роста не описывается простой моделью экспоненциального роста, учет же лимитирования роста бактерий в периодической культуре приводит к знаменитому уравнению Ферхюльста-Пирла или просто логистическому уравнению:

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{K} \right), \quad (1.1.4)$$

где r и K соответственно максимальная удельная скорость роста популяции и предельная емкость среды. Это уравнение - феноменологическое, в нем не заключено никаких гипотез относительно механизмов, определяющих логистический рост популяции. Полезность его состоит в том, что в проинтегрированной форме оно качественно соответствует реальным S-образным кривым роста популяций:

$$N(t) = K \frac{N_0}{N_0 + (K - N_0) \exp(-rt)}, \quad (1.1.5)$$

где N_0 - начальная численность популяции.

Обычно периодическому культивированию свойствен ряд недостатков, которые в какой-то мере ограничивают его широкое применение (Печуркин и др., 1990). В процессе периодического культивирования постоянно меняются параметры, определяющие скорость роста популяции микроорганизмов (например, концентрация субстратов, продуктов метаболизма и т.д.), причем исследователю не всегда известно какие именно. Несмотря на то, что некоторые внешние факторы могут быть зафиксированы (температура среды, рН и т.д.), все же многие характеристики микробного роста не управляемые. Эти недостатки могут быть скомпенсированы при непрерывном культивировании бактерий в хемостате или турбидостате (см. далее).

Периодическое культивирование, хотя скорее и относится к феноменологическому уровню исследований, тем не менее обладает одним несомненным преимуществом по сравнению с непрерывным культивированием - аппаратной простотой. Одним из наиболее ярких примеров использования периодического культивирования является культиви-

вирование микроорганизмов в последовательных пассажах (Ganusov and Bergstrom, 2001; Lenski et al., 1998; Lenski and Travisano, 1994; Levin, 1972; Levin et al., 2000; Nguyen et al., 1989; Papadopoulos et al., 1999; Reynolds, 2000; Sniegowski et al., 1997).

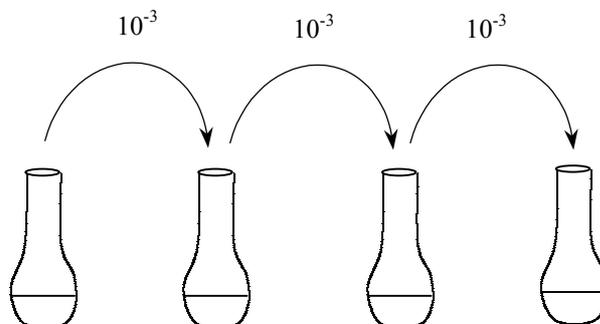


Рис. 1.1.2. Схематическое представление серии периодических культур (серия пассажей), в которой малая часть (на рисунке $d = 10^{-3}$) исходной микробной популяции пересаживается из стационарной фазы в свежую среду, выращивается до стационарной фазы, пересаживается в свежую среду и т.д.

Суть серии последовательных периодических культур (называемой в Levin *et al.*, 2000 serial transferic culture) заключается в следующем. Культура микроорганизмов выращивается в стандартной периодической среде (минимальная, Luria – Bertani (LB), или др. - в зависимости от цели исследования) до стационарной фазы (рис. 1.1.1), а затем малая часть культуры пересаживается в идентичную свежую среду, где процесс роста и последовательной “пересадки” повторяется.

Этот способ культивирования отражает некоторые биологически наблюдаемые ситуации, где бактерии большинство времени находятся в стационарном состоянии при отсутствии какого-либо роста или растут с очень малой скоростью (Awong et al., 1990; Sobecky et al., 1992), что также наблюдается в стационарной фазе при периодическом культивировании (B. Levin & A. Demma, персон. сооб.; (Demma, 2001)), дожидаясь очередной “подпитки”, в течение которой рост микроорганизмов приближенно является экспоненциальным. Такой метод культивирования позволяет наблюдать интереснейшие феномены, как например, сосуществование двух (и теоретически более) разного вида штаммов бактерий при длительном периодическом культивировании (Levin, 1972). Одной из важных особенностей последовательного периодического культивирования является возможность измерения относительной приспособленности бактериальных клеток (fitness), например, плазмидсодержащих и бесплазмидных, в так называемых конкурентных экспе-

риментах (competition experiments) (Ganusov and Bergstrom, 2001) или определение скорости потери плазмид в сегрегационных экспериментах (segregation experiments). Метод конкурентных экспериментов, в частности, был применен в предлагаемой работе и адаптирован для определения зависимости селективного коэффициента плазмидных клеток от эффективности экспрессии генов, клонированных в плазмиде (глава 4, более подробно о конкурентных экспериментах см. (Ganusov and Bergstrom, 2001; Levin et al., 2000; Reynolds, 2000)).

Непрерывное культивирование. В начале 50-х годов были обоснованы и применены в экспериментах два вида непрерывной культуры - с постоянным протоком среды через культиватор (хемостат) и постоянной оптической плотностью биомассы в культиваторе (турбидостат или плотностат) (Dykhuizen and Hartl, 1983; Herbert et al., 1965; Monod, 1950; Novick and Szilard, 1950). Концентрация биомассы в традиционном турбидостате стабилизируется по измерению оптической плотности или мутности культуры, однако в ряде случаев это достигается с помощью измерения ряда других характеристик развивающейся культуры микроорганизмов, изменяющихся одновременно с ростом популяции, как например рН-стат, CO₂-стат и ряд других (Печуркин и др., 1990).

Принципиальной особенностью хемостата является постоянный проток питательной среды с удельной скоростью разбавления D , тогда как в плотностате эту роль играет постоянство плотности популяции микроорганизмов, которое обеспечивается регулировкой скорости разбавления среды: с помощью технических следящих устройств свежая среда подается со скоростью равной скорости прироста микробной популяции. Эта разница особенно очевидна при рассмотрении математических моделей хемостата и плотностата.

В случае хемостатного культивирования рост популяции микроорганизмов описывается следующей системой дифференциальных уравнений (Dykhuizen and Hartl, 1983; Herbert et al., 1965; Pirt, 1975):

$$\begin{aligned} \dot{X} &= (\mu - D)X, \\ \dot{S} &= D(S_0 - S) - \frac{\mu X}{y}, \end{aligned} \quad (1.1.6)$$

где X - численность (плотность) микробной популяции, S_0 , S - концентрация субстрата во входной среде и в ферментере, y - коэффициент экономичности использования субстрата, μ - удельная скорость роста популяции, заданная в виде, предложенном Моно (Monod,

1949), $\mu(S) = \mu_{\max} S / (K_s + S)$, с максимальной скоростью роста μ_{\max} и константой полунасыщения K_s .

Так как в стационарном состоянии $\mu = D$, мы находим следующее выражение для стационарной концентрации субстрата:

$$\tilde{S} = \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D}. \quad (1.1.7)$$

При малых D стационарная удельная скорость роста микробной популяции является очень низкой, следовательно, хемостат позволяет исследовать особенности популяционной динамики популяций микроорганизмов в условиях глубокого лимитирования (т.е. при $\tilde{S} \leq K_s$). При больших скоростях роста хемостат оказывается неустойчивым (Pirt, 1975).

В плотностате удельная скорость разбавления среды определяется плотностью популяции и в идеальном случае задается функцией Хевисайда:

$$D(X) = \begin{cases} 0, & \text{if } X < X_0 \\ D, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1.1.8)$$

Подробный анализ модели (1.1.6) при условии (1.1.8) показывает, что в плотностате микроорганизмы растут с максимально возможной скоростью $\mu \approx \mu_{\max}$, а следовательно турбидостатый метод культивирования позволяет исследовать особенности популяционной динамики популяций микроорганизмов в условиях роста, близкого к экспоненциальному (т.е. нелимитированному).

В целом непрерывное культивирование позволяет проводить экспериментальные исследования для широкого круга вариантов: с различной степенью лимитирования, ингибирования и без внешнего ограничения роста, в пространственно однородных и гетерогенных средах и т.п. и, что самое главное, в постоянных внешних условиях.

Эти особенности демонстрируют подавляющее преимущество непрерывного культивирования над периодическим в изучение многочисленных тонких эффектов регулирования популяционной динамики микроорганизмов (Dykhuizen and Hartl, 1983; Печуркин и др., 1990). Однако эти достоинства в достаточной мере часто скомпенсированы аппаратной сложностью хемостата и уж тем более плотностата (Бейли и Оллис, 1989; Печур-

кин и др., 1990).

Одним из мощных направлений использования управляемого культивирования (как непрерывного и периодического, так и их производных) является биотехнологическое производство различных полезных продуктов (аминокислот, ферментов, белков, интерферонов и т.п.) с помощью генетически модифицированных микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды, в составе которых клонированы гены, ответственные за производство получаемого продукта (Bailey et al., 1986; Bailey et al., 1983; Lee and Bailey, 2000; Бейли и Оллис, 1989). Часто, однако, эти рекомбинантные штаммы оказываются нестабильными именно при длительном культивировании, т.е. теряют способность производить полезный продукт, что связано часто либо с потерей плазмиды, либо с изменением экспрессии клонированных генов. Периодическое и непрерывное культивирование предлагают широкий набор средств для изучения особенностей такого рода нестабильности плазмидсодержащих клеток при их культивировании в различных условиях (Bentley et al., 1990; Brownlie et al., 1990; Duetz and van Andel, 1991; Godwin and Slater, 1979; Noack et al., 1981; Wouters et al., 1980).

1.2. Нестабильность рекомбинантных штаммов микроорганизмов при управляемом культивировании

Рекомбинантным микроорганизмом обычно называют штамм, содержащий в своем составе рекомбинантную плазмиду (или несколько плазмид). В свою очередь, рекомбинантная плазида получается клонированием с помощью методов генетической инженерии определенных генов (например, высших растений, животных и в том числе и человека) в особой молекуле, называемой вектором (Бейли и Оллис, 1986; Summers, 1996).

Векторы- это молекулы ДНК, обеспечивающие амплификацию (экстракопирование) фрагмента ДНК в растущей популяции клеток. Чтобы вектор отвечал всем предъявляемым к нему в процессе клонирования требованиям, он должен обладать следующими свойствами (Бейли и Оллис, 1989):

1. Способностью реплицироваться в клетке-хозяине.
2. Способностью включать чужеродные ДНК различной молекулярной массы без нарушения способности к репликации.
3. Легкостью введения в клетку-хозяина после включения чужеродной ДНК.
4. Наличием *генетического маркера селекции*, обеспечивающего быструю положительную селекцию клеток, содержащих вектор.
5. Наличие только одного сайта, подвергающегося расщеплению одной или несколькими рестрикционными эндонуклеазами.

Для клонирования ДНК в самой распространённой для изучения энтеробактерии *Escherichia coli* применяют два класса векторов - плазмиды и бактериофаги. Наибольшее внимание при работе с рекомбинантными штаммами бактерий уделяется, несомненно, плазмидным векторам.

Плазмидой называется молекула ДНК, существующая и реплицирующая независимо от бактериальной хромосомы (Actis et al., 1998; Lederberg, 1998; Summers, 1996). Плазмиды обычно представляют собой относительно небольшие (по сравнению с хромосомальной ДНК) кольцевые (или линейные) молекулы с молекулярной массой порядка 10^6 - 10^8 дальтон, или 5 - 100 т.п.о. (рис. 1.2.1). Плазмиды обычно не выполняют каких-либо существенных функций в нормальных условиях жизнедеятельности микроорганизмов, зачастую снижая скорость роста микробной плазмидсодержащей популяции, но в то же время могут обеспечивать клетку рядом полезных (в специфических условиях) качеств (Lenski, 1991; Lenski, 1993). Установлено, например, что плазмиды, называемые R-

факторами (факторами устойчивости), обуславливают устойчивость бактерий к антибиотикам, а *D*-плазмиды (или плазмиды биодegradации) кодируют ряд ферментов, обеспечивающих расщепление тяжелых углеводов (Печуркин и др, 1990; Щелкунов, 1987; Боронин и др., 1985).

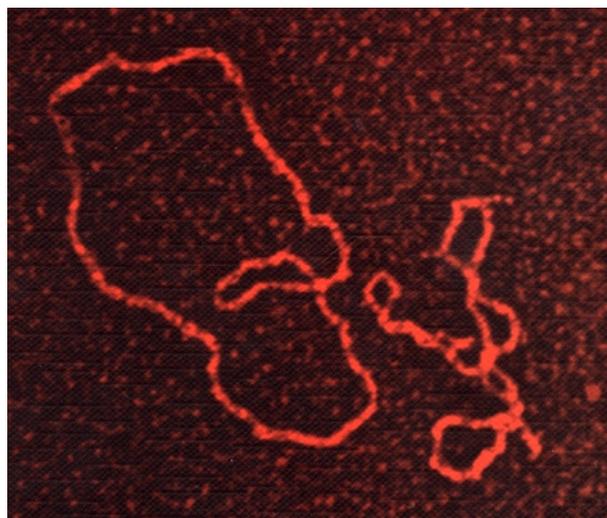


Рис. 1.2.1. Электронная микрофотография плазмиды pSC101 ($\times 230000$). Эта кольцевая ДНК, существующая и реплицирующая независимо от бактериальной хромосомы, была важным инструментом в первых экспериментах с рекомбинантными ДНК (из Бейли и Оллис, 1989).

К числу наиболее популярных плазмидных векторов для клонирования в *E. coli* относится плазида pBR322 (рис. 1.2.2), содержащая ряд единичных сайтов рестрикции, гены устойчивости к тетрациклину и ампициллину, а также гены контроля копийности плазмиды, обеспечивающие амплификацию плазмиды в клетке и последовательное стабильное наследование плазмиды в популяции микроорганизмов при длительном культивировании.

Таким образом, при помощи методов генной инженерии и молекулярной биологии мы имеем возможность синтезировать ряд ценных эукариотических белков, встраивая соответствующие нуклеотидные последовательности в вектора, обеспечивающие репликацию и эффективную экспрессию рекомбинантных генов.

Однако в многочисленных экспериментальных исследованиях было обнаружено, что довольно часто длительное культивирование плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов приводит к элиминации рекомбинантных клеток и замене их на бесплазмидные варианты (Brownlie et al., 1990; Bugeja et al., 1989; de Taxis du Poet et al., 1986;

Godwin and Slater, 1979; Jones et al., 1980; Keevil et al., 1987; Kleinman et al., 1986; Lee and Lee, 1994; Melling et al., 1977; Noack et al., 1981; O'Kennedy and Patching, 1997; Ramesh et al., 1995; Sayadi et al., 1987; Sterkenburg et al., 1988; Wouters et al., 1980).

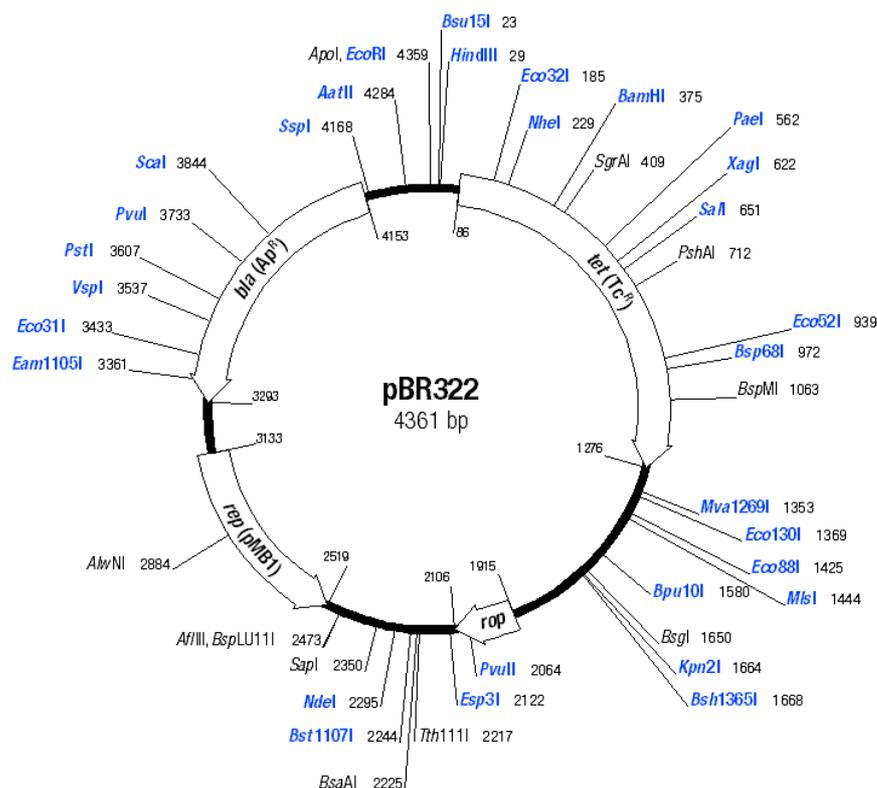


Рис. 1.2.2. Генетическая карта плазмиды pBR322. Показаны локусы генов и ряд сайтов рестрикции. Расшифрована последовательность всех 4361 пары оснований плазмиды (из базы данных MBI *Fermentas inc.*)

Такого рода популяционная неустойчивость штаммов микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды, обусловлена тремя основными причинами (Вельков, 1983, Печуркин и др, 1990; Щелкунов, 1987; Imanaka and Aiba, 1981):

- 1) сегрегацией плазмид, когда часть клеток популяции утрачивает плазмиды при делении;
- 2) нестабильностью генетической структуры плазмид, при которой плазмиды сохраняются в популяции, но в измененном виде;
- 3) отличием кинетических характеристик роста популяции штамма, содержащего активно функционирующие плазмиды, в сравнении с аналогичными у бесплазмидного штамма, либо у штамма, содержащего измененные плазмиды.

Отличие кинетических характеристик служит своеобразным "усилителем" неста-

бильности рекомбинантных клеток, поскольку благодаря ему создается селективное преимущество в скорости размножения бесплазмидного штамма и штамма с измененными плазмидами. Если же в экспериментах при длительном культивировании наблюдается практически 100%-ная стабильность рекомбинантного штамма, то это означает либо низкую вероятность образования сегрегантов или измененных плазмид, либо неконкурентоспособность этих вариантов по сравнению с исходным штаммом.

Сегрегационная (репликационная) нестабильность плазмид обычно обусловлена отсутствием (или нарушением) в векторах генов, ответственных за автономную репликацию плазмид (снижение эффективности контроля копийности, (Actis et al., 1998; del Solar et al., 1998; Nordstrom et al., 1984)); отсутствием системы, способствующей расщеплению мультимеров в клетке (например, система *cer-XerD* плазмиды ColE1, (Summers, 1998; Summers et al., 1985; Summers and Sherratt, 1984)); отсутствие механизмов точного распределения плазмидных копий между дочерними клетками при делении материнской (что обычно существенно для малокопийных плазмид, (Williams and Thomas, 1992)) и ряд других факторов, рассмотренных более подробно в главе 3.

К настоящему времени установлено, что в регуляции репликации плазмид бактерий участвуют следующие детерминанты, образующие *репликон* (Actis et al., 1998; del Solar et al., 1998; Khan, 1997; Nordstrom et al., 1984; Rasooly and Rasooly, 1997; Summers, 1996; Thomas, 1988):

- а) последовательность нуклеотидов, с которой происходит инициация репликации (*ori*- участок, некоторые плазмиды, как, например *F*, содержат несколько таких участков);
- б) структурные гены *rep*, контролирующие репликацию плазмиды (например, *RepA*- белок в плазмиде R1 или RNAII в плазмиде ColE1);
- в) детерминанты негативного контроля копийности плазмид *cop* (обычно молекулы РНК суммировано в (Actis et al., 1998; Summers, 1996)).

Обычно для преодоления сегрегационной нестабильности рекомбинантных штаммов в настоящее время используют следующие две группы методов (Kumar et al., 1991):

1. Включение в состав гибридных плазмид генов, без которых рост клеток в заданных условиях невозможен, или использование генов, контролирующих биосинтез аминокислот для повышения стабильности плазмидсодержащих, ауксотрофных по этим аминокислотам штаммов.

2. Создание условий, в которых клетки, потерявшие плазмиды, погибают. Такое се-

лективное давление в пользу плазмидсодержащих клеток бактерий часто создается добавлением антибиотика в среду для культивирования, когда плазмиды содержат гены антибиотикоустойчивости.

Нестабильность генетической структуры плазмид обусловлена спонтанными изменениями их генетической структуры, например, точечными заменами нуклеотидов, делециями, дупликациями, встройками *IS*-элементов и транспозонов и т.д. Иногда штаммы с измененными плазмидами имеют селективное преимущество по сравнению с исходным вариантом, что, однако, зависит от условий роста популяции, типа ограничения пищевых потребностей, характера изменений в структуре плазмид и др. (Godwin and Slater, 1979).

Кроме элементов, способных к транслокации, возможной причиной структурной нестабильности рекомбинантных плазмид могут быть топологические особенности вторичной структуры плазмид. К таким особенностям относится, например, образование шпилек в последовательностях ДНК, являющихся палиндромами (Вельков, 1983).

Плазмидные векторы, часто сконструированные довольно произвольным образом с учетом удобства клонирования и отбора трансформантов, при длительном культивировании иногда утрачивают целые фрагменты (Duetz and van Andel, 1991; Williams et al., 1988). Если структура природных плазмид создавалась в результате длительного действия естественного отбора на стабильность, то в случае рекомбинантных плазмид эту работу приходится проводить генным инженерам, причем часто в направлении, противоположном действию естественного отбора (Печуркин и др., 1990).

Кинетическая неустойчивость плазмидных штаммов микроорганизмов обусловлена снижением удельной скорости роста популяции, содержащей рекомбинантные плазмиды, по сравнению с изогенным бесплазмидным вариантом (Aiba et al., 1982; Bentley et al., 1990; Imanaka et al., 1980; Zund and Lebek, 1980). Например, как Zund и Lebek обнаружили, этот эффект особенно четко наблюдался для штаммов, содержащих либо большие по размеру (>100 т.п.о.), либо высококопийные (>20 копий на клетку) плазмиды. Несмотря на то, что большая часть исследований подобного типа проведена с использованием природных *R*-плазмид бактерий, снижение скорости роста плазмидсодержащих бактерий также справедливо и для плазмид биodeградации (Боронин и др., 1985), и многих других (Печуркин и др., 1990). Наиболее вероятной причиной этого эффекта является отвлечение биосинтетического аппарата клеток на обеспечение плазмидных функций, либо непосредственное торможение скорости роста продуктами плазмидных генов (Bailey et al., 1986; Bentley et al., 1990; Peretti and Bailey, 1987).

В дополнение хотелось бы подчеркнуть, что до сих пор точного соответствия между полным количеством плазмидной ДНК в хозяйской клетке (число копий плазмиды \times размер плазмиды) и обусловленное плазмидой снижение скорости роста плазмидосодержащих штаммов микроорганизмов предложено не было (Smith and Bidochka, 1998; Zund and Lebek, 1980). Более того, в наших экспериментах мы обнаружили, что снижение скорости роста плазмидных клеток связано не просто с присутствием дополнительной ДНК в клетках микроорганизмов, а скорее всего с уровнем эффективной экспрессии, которую проявляют гены, клонированные в плазмиде (см. главу 4; Aiba et al., 1982; Bentley et al., 1990; Lenski et al., 1994b; Nguyen et al., 1989; Seo and Bailey, 1985).

Для описания популяционной динамики нестабильных рекомбинантных штаммов микроорганизмов наиболее продуктивное развитие получила модель, разработанная и проанализированная Ф. Стюартом и Б. Левиным (далее просто модели ЛС) (Levin and Rice, 1980; Levin and Stewart, 1977; Levin and Stewart, 1980; Levin et al., 1979; Stewart and Levin, 1977), обзор других моделей см. в Боронин и др., 1983). Эта модель описывает динамику плазмидосодержащих и бесплазмидных клеток в хемостате и, основываясь на законе действующих масс, включает в себя следующие процессы: рост плазмидной X^+ и бесплазмидной X^- популяций с удельными скоростями роста μ^+ и μ^- , образование бесплазмидных клеток при делении плазмидосодержащих клеток с вероятностью τ_0 , конъюгативный перенос плазмид от плазмиднесущих клеток к бесплазмидным с удельной скоростью γ и изменение концентрации субстрата, ограничивающий рост обеих популяций, S . В приложении к условиям роста в непрерывной культуре модель ЛС представляет следующую систему дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dX^+}{dt} = (\mu^+ - D) \cdot X^+ - \tau_0 \mu^+ X^+ + \gamma X^+ X^-, \\ \frac{dX^-}{dt} = (\mu^- - D) \cdot X^- + \tau_0 \mu^+ X^+ - \gamma X^+ X^-, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu^+ X^+}{y^+} - \frac{\mu^- X^-}{y^-}, \end{cases} \quad (1.2.1)$$

где D - удельная скорость разбавления среды в хемостате, S_0 - концентрация субстрата во входной среде, функции удельных скоростей роста μ^\pm заданы в виде:

$\mu^+(S) = \mu_{\max}^+ S / (S + K_S^+)$ и $\mu^-(S) = \mu_{\max}^- S / (S + K_S^-)$. В последующем анализе мы часто будем использовать параметр, названный селективным коэффициентом (Stewart and Levin, 1977), “стоимостью плазмиды” (Levin and Stewart, 1977) или селективным преимуществом бесплазмидных клеток (Печуркин и др., 1990; Брильков и др., 1990), который выражается через отношение удельных скоростей роста плазмидных и бесплазмидных клеток:

$$\alpha(S) = 1 - \frac{\mu^+(S)}{\mu^-(S)}, \quad (1.2.2)$$

и в общем случае зависит от концентрации субстрата в среде.

Очевидно, что положительные значения α означают, что плазмиды обуславливают дополнительную метаболическую нагрузку на клетку-хозяина, так что скорость роста плазмидного штамма меньше, чем бесплазмидного варианта. В селективных же для поддержания плазмид условиях, селективный коэффициент может достигать бесконечно больших (негативных) значений при отсутствии роста бесплазмидных клеток ($\mu^- \rightarrow 0$).

Математическая модель (1.2.1) использовалась рядом исследователей для изучения как причин нестабильного поддержания рекомбинантных штаммов микроорганизмов при управляемом культивировании (Печуркин и др., 1990) и стабильного наследования природных плазмид в реальных экосистемах (Levin and Stewart, 1977; Stewart and Levin, 1977), так и строгого математического анализа динамики микроорганизмов в различных условиях культивирования в хемостате (в селективной и неселективной среде, при конкуренции за несколько субстратов и т.п.) (Ai, 2001; Hsu et al., 1995; Lu and Haderler, 1998; Smith and Waltman, 1995). Например, одним из интересных выводов в работе Stewart & Levin (1977) было нахождение условия, при котором оказывается возможным стабильное поддержание конъюгативных плазмид в природной популяции:

$$\hat{\gamma} \cdot N > \alpha + \tau_0, \quad (1.2.3)$$

где N - численность бесплазмидной популяции и $\hat{\gamma} = \gamma / \mu^+$ (Bergstrom et al., 2000). Это утверждение, в частности, показывает, что неконоъюгативные плазмиды ($\gamma = 0$) в конце концов элиминируются из хемостата в неселективных для поддержания плазмид условиях (что верно при $\alpha > 0$). Более полный математический анализ модели (1.2.1) был проведен

в серии работ Апонина с соавт. (Апонин, 1982; Апонин и др., 1984, Апонина и др., 1984), где также были рассмотрены модели непрерывных культур микроорганизмов, содержащих нестабильные гибридные плазмиды (Апонин и Апонина, 1996).

Несмотря на широту практического применения (Proctor, 1994), модель ЛС, как и многие другие *немеханистические* модели популяционной динамики плазмид (см. обзор в Печуркин и др., 1990), обладает рядом серьезнейших недостатков, среди которых наиболее важными являются феноменологичность описания процесса потери плазмид при делении, неучитывание эффективности контроля копийности плазмид и его связи с условиями культивирования, и, как следствие, отсутствие такого понятия как многокопийность бактериальных плазмид, что означает наличие *нескольких* копий плазмиды в клетках микроорганизмов.

Эти процессы учтены в математических моделях, разработанных в следующей главе (глава 2). Для построения такого рода моделей необходимо знание основных компонентов, вовлеченных в регуляцию контроля репликации плазмид и их сегрегации при делении. В следующей части рассмотрен пример контроля копийности плазмиды ColE1, который лежит в основе таких распространенных векторов для клонирования генов как pBR322 и pUC18.

1.3. Механизмы контроля копийности плазмид на примере плазмиды ColE1

Природные плазмиды в течение длительного эволюционного процесса “разработали” целый набор средств, обеспечивающих их стабильное наследование в популяциях микроорганизмов, как например способность к конъюгативному переносу (Levin et al., 1979). Однако наиболее удивительным свойством плазмид микроорганизмов является способность поддержания примерно постоянного числа копий плазмиды (при заданных условиях культивирования) в клетках-хозяевах при последовательной пролиферации плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов. Эта способность вовлекает ряд генов, кодируемых плазмидой и обеспечивающих *контроль репликации плазмид*.

Наиболее подробно молекулярные основы контроля копийности бактериальных плазмид изучены на примере двух молекул: малокопийной R1 (Nordstrom et al., 1984) и высококопийной ColE1 (Brenner and Tomizawa, 1991). Так как наш основной анализ будет сосредоточен на изучении популяционной динамики *многокопийных* плазмид (таких как pBR322 и подобных), мы рассмотрим как плазмиды регулируют свою копийность на примере плазмиды ColE1 (названной так из-за производства колицина E1, ингибирующего рост бесплазмидных клеток, (Summers, 1996, Брода, 1982)).

Плаزمида ColE1 является небольшой плазмидой, широко распространенной в природных популяциях. Её молекулярный вес составляет $4.2 \cdot 10^3$ килодальтон, и длина - 6646 пар нуклеотидных оснований. ColE1 не обладает способностью к конъюгационному переносу, хотя и содержит гены, обеспечивающие ее мобилизацию в клетки-реципиенты со многими конъюгативными плазмидами, например с фактором *F* (Брода, 1982). Обычная бактериальная клетка содержит 10-50 копий плазмиды, и согласно, условной классификации (Summers, 1996), ColE1 относится к классу высококопийных плазмид.

Многокопийные плазмиды обычно не обладают системами активного распределения плазмид между дочерними клетками при делении материнской (Nordstrom and Austin, 1989; Williams and Thomas, 1992), а, следовательно, копии плазмиды сегрегируют независимо, и, таким образом, случайно. Случайное распределение плазмид при делении ведет к значительной вариации числа копий плазмиды в клетках микроорганизмов в начале клеточного цикла. В этом случае основной задачей эффективного контроля копийности плазмид является выравнивание среднего числа копий на клетку в популяции (или другими словами, уменьшение вариации изначально высокодисперсного распределения клеток с различной копийностью) к началу митотического деления (Paulsson and Ehrenberg, 1998).

Репликация плазмид типа ColE1 изучалась достаточно подробно (как теоретически, так и экспериментально) как модельная система для исследования стабильного поддержания плазмидных репликонов в растущих культурах микроорганизмов. Контроль копийности плазмиды ColE1 зависит от ингибирования *cis*-действующей препраймерной РНК (названной RNAII) *tran*-действующей антисенсной РНК (названной RNAI) (Masukata and Tomizawa, 1986; Tomizawa, 1984; Tomizawa and Itoh, 1981).

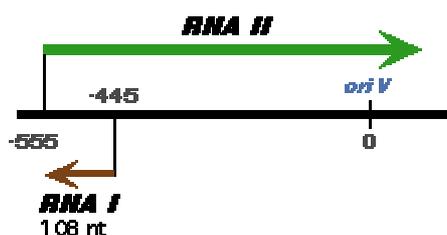


Рис. 1.3.1. Схематическое расположение генетических элементов, кодирующих препраймерную РНК (RNAII) и ингибиторную РНК (RNAI).

Транскрипция молекулы RNAII инициируется 555 п.о. выше (upstream) участка начала репликации *ori* (см. рис. 1.3.1), тогда как RNAI (обычно длиной от 108 до 110 п.о.) считывается с цепи ДНК, комплиментарной участку, кодирующему RNAII, начиная с сайта, расположенного выше на 455 п.о. от начала репликации (Morita and Oka, 1979; Tomizawa and Itoh, 1981; Tomizawa et al., 1981). Образование пре-праймера чувствительно к атаке молекулой RNAI, когда транскрипция происходит в так называемом “окне ингибирования” (inhibition window), которое простирается примерно от 100 нуклеотидной пары до 360 пары последовательности, кодирующей молекулу RNAII (Tomizawa, 1986). Если RNAI и RNAII образуют изначально нестабильный комплиментарный (“kissing”) комплекс, который впоследствии преобразуется в стабильный дуплекс во время транскрипции RNAII (Tomizawa, 1990a), конформационные изменения молекулы RNAII приведут к формированию неполноценного пре-праймера, и, следовательно, к нарушению репликации плазмиды (см. рис. 1.3.2).

Небольшой, кодируемый генами плазмиды полипептид, Rom (RNA One Modulator), стабилизирует взаимодействие между RNAI и RNAII, увеличивая вероятность образования стабильного комплекса RNAI-RNAII после изначально нестабильного связывания (Tomizawa, 1990b; Tomizawa and Som, 1984). Если же комплекс между RNAI и RNAII не образуется к окончанию окна ингибирования (временная длительность этого процесса всего ~5 секунд), RNAII формирует стабильный гибрид с участком плазмидной ДНК, рас-

положенным рядом с *ori*.

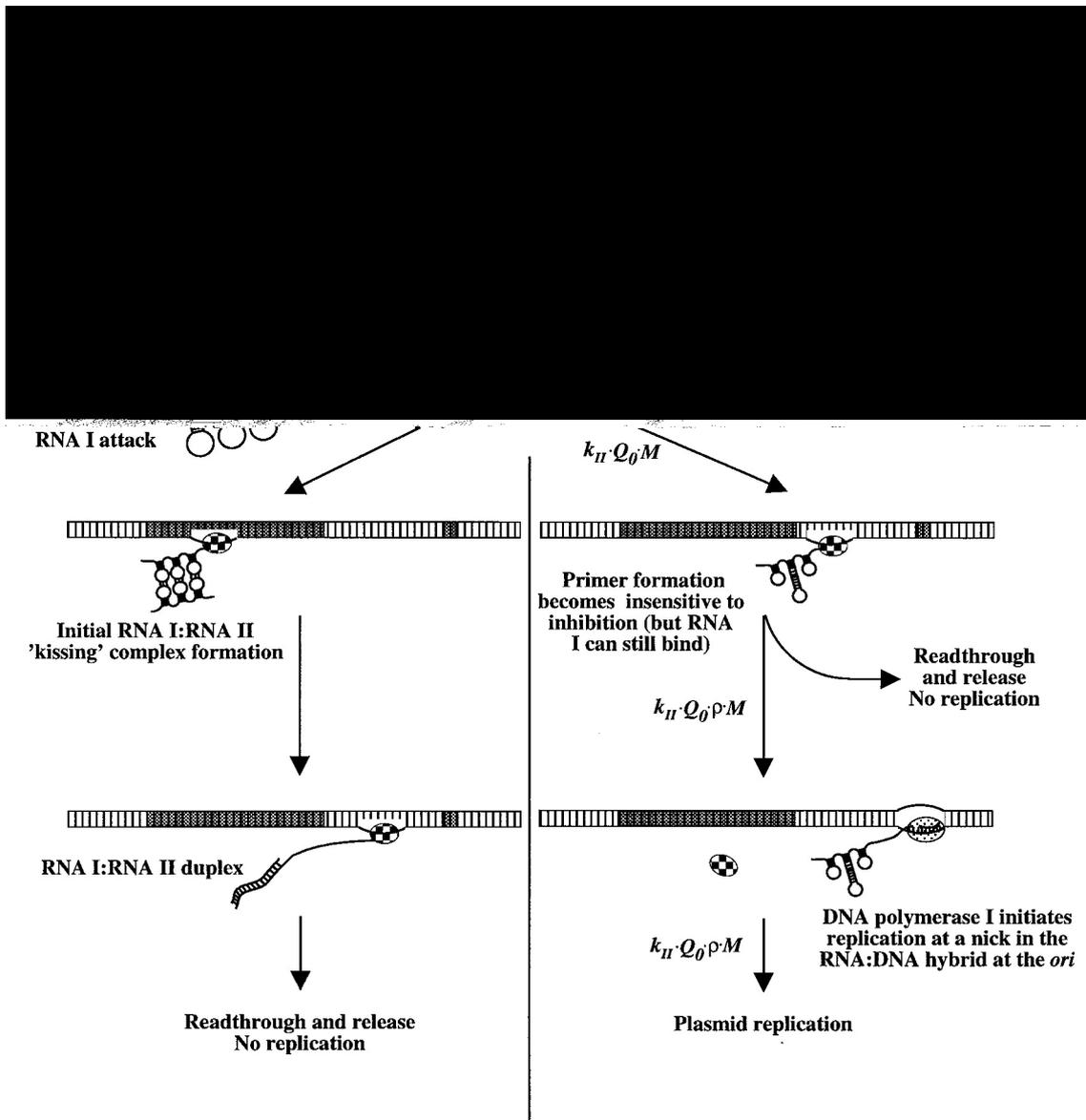


Рис. 1.3.2. Схематическое представление процесса репликации плазмиды ColE1. Пре-праймерная RNAII (0-555 п.о.) и ингибиторная RNAI (2-110 п.о., рис. 1.3.1) производятся с постоянными скоростями (соответственно k_{II} и k_I). RNAI и RNAII способны образовывать комплементарный комплекс, который при его образовании в окне ингибирования (110-360 п.о.) приводит к ингибированию образования праймера. M обозначает число плазмид в клетке, а Q_0 - вероятность формирования полноценного праймера для ДНК полимеразы, ρ - вероятность репликации плазмиды, при условии, что праймер для ДНК полимеразы успешно образовался (заимствовано из (Paulsson & Ehrenberg, 1998)).

Несущественные части RNAI в этом ДНК-РНК комплексе "подчищаются" РНКазой H , что приводит к образованию полноценного праймера для ДНК полимеразы I (Tomizawa and Itoh, 1981). Несмотря на то, что RNAI способна образовывать нестабильный комплекс

с RNAII за окном ингибирования, этот процесс уже не влияет на образование полноценного праймера (Tomizawa, 1986).

Таким образом, экспрессия молекулы RNAII с постоянной скоростью приводит к репликации плазмид, которая в свою очередь негативно регулируется антисенсной RNAI. Но как изменение в концентрации ингибиторной молекулы влияет на вероятность образования полноценного праймера, задаваемую Q_0 ? Ответ на этот вопрос был получен в работах (Ehrenberg, 1996; Paulsson and Ehrenberg, 1998; Paulsson et al., 1998).

Формированию репликационного праймера ингибируется антисенсной молекулой только в окне ингибирования, состоящего приблизительно из 250 пар оснований (рис.1.3.2). Так как на каждом шаге (основании) при транскрипции RNAII ингибиторная молекула может образовать стабильный комплекс с пре-праймером, то вероятность транскрипции полноценной праймерной молекулы без присоединения RNAI вычисляется согласно выражению:

$$Q = \prod_{i=110}^{360} \frac{p_i}{p_i + q_i R}, \quad (1.3.1)$$

где p_i - вероятность транскрипции RNAII от основания i до основания $i+1$ без связывания с комплементарной RNAI, $q_i R$ - вероятность образования стабильного комплекса RNAI-RNAII на шаге $i \rightarrow i+1$ с концентрацией RNAI равной R (Paulsson et al., 1998). Предполагая, что из 250 оснований, только m являются лимитирующими, мы находим вероятность образования полноценного праймера:

$$Q = \left(\frac{1}{1 + R/(k \cdot m)} \right)^m, \quad (1.3.2)$$

где $k = \frac{1}{m} \sum_{i=110}^{360} \frac{p_i}{q_i}$.

Два предельных случая выражения (1.3.2) заслуживают особого внимания. Во-первых, при $m = 1$ мы находим вероятность образования полноценного праймера:

$$Q = \frac{1}{1 + R/k}, \quad (1.3.3)$$

которое соответствует гиперболическому механизму ингибирования (Ehrenberg, 1996; Paulsson et al., 1998), также верно для плазмиды R1 (Blomberg et al., 1992; Blomberg et al., 1990; Keasling and Paulsson, 1989; Leipold et al., 1994; Nordstrom et al., 1984; Nordstrom and Wagner, 1994; Paulsson and Ehrenberg, 2000; Rosenfeld and Grover, 1993a). Если же число лимитирующих шагов велико (например все 250 пар оснований), в пределе $m \rightarrow \infty$, мы получаем (Ehrenberg, 1996; Paulsson et al., 1998):

$$Q = \exp\left(-\frac{R}{k}\right). \quad (1.3.4)$$

Этот механизм ингибирования, названный экспоненциальным (Ehrenberg, 1996; Paulsson et al., 1998), обуславливает значительное изменение в вероятности образования репликационного праймера Q , при достаточно умеренном уменьшении/увеличении концентрации молекулы RNAI. Экспоненциальным механизм ингибирования является наиболее вероятным кандидатом на контроль копийности плазмиды ColE1, хотя и твердых доказательств этому пока нет (Brenner and Tomizawa, 1991; Paulsson et al., 1998).

Таким образом, на примере плазмиды ColE1 мы продемонстрировали, как бактериальные плазмиды регулируют свою численность в клетках микроорганизмов. Следующие главы (глава 2 и 3) посвящены исследованию вопроса как эффективность контроля копийности плазмид и наличие нескольких копий плазмиды в клетках штаммов микроорганизмов влияют на стабильность поддержания плазмидсодержащих бактерий при управляемом культивировании.

Г Л А В А 2

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ ПЛАЗМИД

2.1. Точная математическая модель популяционной динамики плазмид

Как было упомянуто в предыдущей главе, стабильное наследование плазмид от материнской клетки к дочерней в популяции микроорганизмов должно вовлекать негативный (или для ряда плазмид, как например P1, F, λ -dv, позитивный (Summers, 1996)) контроль репликации плазмид с последующим распределением реплицированных плазмид между двумя дочерними клетками при делении материнской клетки. Следовательно, каждая плазида за время генерации клетки-хозяина проходит через следующую цепь последовательных событий: “репликация (в течение клеточного цикла)→ сегрегация (при делении материнской клетки)→ репликация→ сегрегация→ репликация→...”. Опираясь на такую схематическую картину процессов репликации и распределения плазмид, для описания процесса наследования плазмид в популяции бактерий может быть построена соответствующая математическая модель.

Пусть $p_i(g)$ есть вероятность обнаружения клетки с i копиями плазмиды в популяции микроорганизмов после g генераций (равная, очевидно, числу клеток с копийностью i , деленное на полное число микроорганизмов в популяции X_i/X), $\lambda(i \rightarrow j)$ - вероятность процесса дорепликации плазмиды от копийности i до копийности j в течение клеточного цикла, $\xi(i, j)$ - вероятность того, что при делении материнской клетки с $i+j$ копиями плазмиды i копий попадет в одну дочернюю клетку и j в другую (рис 2.1.1).

Тогда полная вероятность обнаружения клетки с k копиями плазмиды в следующем поколении ($g+1^{\text{я}}$ генерация) вычисляется в соответствии со схемой, приведенной на рис. 2.1.1: вероятность того, что при наличии i плазмид (p_i) они дореплицируются до j плазмид $\lambda(i \rightarrow j)$ и при распределении j плазмид при делении k копий попадет в одну из дочерних клеток $\xi(k, j-k)$. Этот процесс можно описать следующей бесконечной системой разностных уравнений:

$$p_i(g+1) = \sum_{j=i}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} \lambda(k \rightarrow j) \xi(j-i, i) p_k(g), \quad i \geq 0 \quad (2.1.1)$$

Очевидно, что эта система не описывает реальный рост микроорганизмов, где ско-

росту роста ограничивается доступность ресурсов, т.к. полное число клеток в популяции растет экспоненциально (Печуркин, 1978): $X(g) = X(0)2^{g-1}$. Экспоненциально растущая популяция плазмидсодержащих микроорганизмов, подчиняющаяся выражению (2.1.1), может наблюдаться в логарифмической фазе роста в периодической культуре (см. рис. 1.1.1) или при культивировании в турбидостате (рН-стате и т.п.).

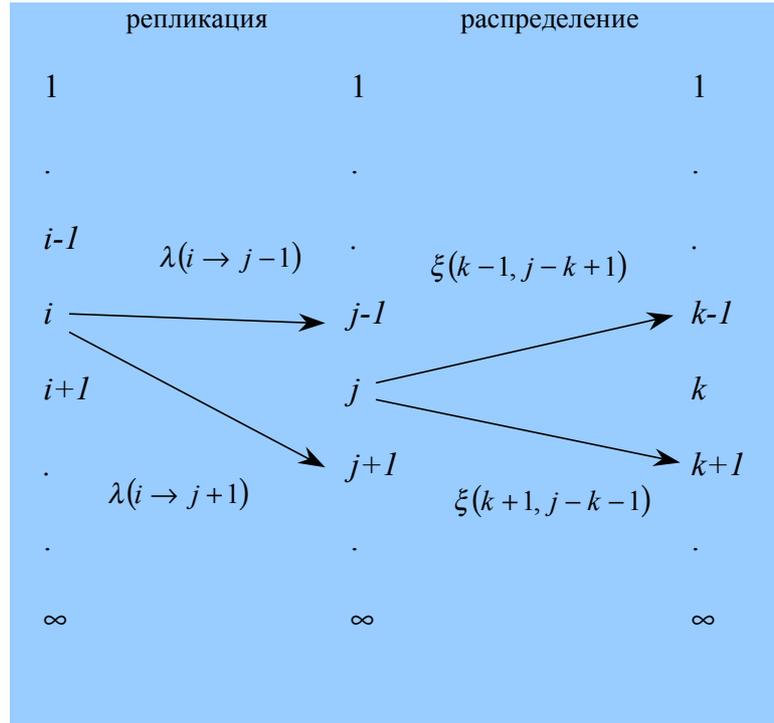


Рис. 2.1.1. Процесс репликации-сегрегации плазмид при росте-делении бактериальной клетки. Этот процесс (как описано в основном тексте) происходит в два основных этапа: *репликация* плазмид с начального числа i (которое задается распределением p_i) до некоторого промежуточного значения j , которое в свою очередь определяется механизмом контроля копийности и в какой-то мере стохастикой процесса репликации; и распределение j плазмид при делении клетки согласно одному из двух основных механизмов (случайное или точное).

Следовательно, математическая модель (2.1.1) описывает экспоненциальный рост плазмидсодержащих микроорганизмов в периодической культуре, тогда как в случае хемотратного культивирования модель (2.1.1) может быть переписана в виде:

$$\begin{aligned}
 X_i(g+1) &= \sum_{j=i}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} \lambda(k \rightarrow j) \xi(j-i, i) \mu_k(S(g)) X_k(g) - DX_i(g), \\
 S(g+1) &= D(S_0 - S(g)) - \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=i}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} \lambda(k \rightarrow j) \xi(j-i, i) \mu_k(S(g)) \frac{X_k(g)}{y_k},
 \end{aligned}
 \tag{2.1.2}$$

где S , S_0 - концентрация лимитирующего рост бактерий субстрата в ферментере и во входной среде, D - скорость протока среды с хемостате, y_i - коэффициент эффективности использования субстрата бактериями с i плазмидами, время g дано в генерациях, $t_{gen} \approx \ln(2)/D$, или в непрерывном времени:

$$\begin{aligned} \dot{X}_i(t) &= \sum_{j=i}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} \lambda(k \rightarrow j) \xi(j-i, i) \mu_k(S(t-\Delta_k)) X_k(t-\Delta_k) - DX_i(t), \\ \dot{S}(t) &= D(S_0 - S(t)) - \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=i}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} \lambda(k \rightarrow j) \xi(j-i, i) \mu_k(S(t-\Delta_k)) \frac{X_k(t-\Delta_k)}{y_k}, \end{aligned} \quad (2.1.3)$$

где $\Delta_k = \ln 2/\mu_k$ - время генерации клетки с k копиями плазмиды.

При всей своей видимой простоте, математическая модель (2.1.2)-(2.1.3), кроме требующих определения переменных $\{X_i, S\}$, содержит также три основные функции (λ, ξ, μ) , которые остались неопределенными, что делает аналитический анализ общей модели (2.1.3)¹ практически невозможным. Однако накопленные к настоящему времени знания о контроле репликации и распределении некоторых неконъюгативных бактериальных плазмид (см. также главу 1) позволяют предложить несколько различных форм для функций λ, ξ, μ .

1. *Распределение плазмид между дочерними клетками $\xi(i, j)$.* К настоящему времени было предложено по крайней мере три механизма распределения плазмид по дочерним клеткам при делении материнской клетки (Nordstrom, 1984; Nordstrom and Austin, 1989; Nordstrom et al., 1980a; Nordstrom et al., 1980b; Nordstrom et al., 1984; Rosenfeld and Grover, 1993b; Williams and Thomas, 1992): случайное (когда каждая дочерняя клетка имеет равную вероятность получить копию плазмиды при делении, что описывается биномиальным распределением для деления бактерий или мультиномиальным для дрожжей), равное распределение (когда каждая дочерняя клетка получает одинаковое количество плазмид) и смешанное распределение (когда каждая дочерняя клетка получает как минимум одну плазмиду, а остальные копии плазмиды распределяются случайно). Случайное (или пассивное) распределение плазмид скорее всего преобладает в плазмидах с высокой копийностью (точнее, для плазмид с числом копий >15 на клетку не найдено механизма, обес-

¹ Все дальнейшие рассуждения относятся также и к дискретному варианту (2.1.2).

печивающего активное распределение плазмид по дочерним клеткам), тогда как малокопийные плазмиды обладают несколькими классами локусов (*par*, *sop* и другие), ответственными за активную сегрегацию плазмид при делении (Nordstrom and Austin, 1989; Williams and Thomas, 1992). Отметим также, что *par*-локус, первоначально обнаруженный в составе плазмиды pSC101 (Meacock and Cohen, 1980) не является компонентой активного распределения плазмид при делении, а скорее играет некоторую роль в расщеплении прореплицированных плазмидных комплексов и, благодаря этому, также влияет на стабильность плазмид (см. также главу 3). В дополнение можно отметить, что к данному моменту точность экспериментальных исследований не позволяет определить разницу в стабильности плазмид, обладающих точным или смешанным механизмами распределения (Nordstrom, 1984), а, следовательно, эти механизмы являются неразличимыми с экспериментальной точки зрения. Такое ограничение на тип распределения плазмид среди дочерних клеток при делении материнской клетки однозначно определяет функцию $\xi(i, j)$, которая имеет вид в случае *случайного* и *точного* распределений:

$$\xi(i, j) = 2^{-(i+j)} \frac{(i+j)!}{i!j!}, \quad (2.1.4)$$

$$\xi(i, j) = \delta_{ij} + \frac{1}{2}(\delta_{ij-1} + \delta_{ij+1}) = \begin{cases} 1, & \text{если } i = j \\ 0.5, & \text{если } i = j \pm 1 \\ 0, & \text{в других случаях} \end{cases} \quad (2.1.5)$$

где δ_{ij} - символ Кронекера.

2. *Удельная скорость роста бактерий с i копиями плазмиды μ_i .* При всей очевидности, что такая зависимость должна существовать, экспериментальная связь между скоростью роста бактериального штамма и количеством плазмидной ДНК, которое этот штамм содержит, практически не изучена (см., например, (Chiang and Bremer, 1988; Nguyen et al., 1989; Smith and Bidochka, 1998)). Одними из первых, кто проанализировал влияние размера плазмиды и/или копийности плазмиды на скорость роста плазмидсодержащих микроорганизмов были Zund и Lebek (Zund and Lebek, 1980). Они обнаружили, что снижение скорости роста исходного штамма бактерий происходит при наличии в клетке бактерии плазмиды либо с копийностью выше, чем 20 копий на клетку, либо при размере плазмиды более 100 т.п.о. Однако однозначного соответствия так найдено и не

было (Nguyen et al., 1989; Smith and Bidochka, 1998; Uhlin and Nordstrom, 1977; Zund and Lebek, 1980). В главе 4 на примере плазмиды pGLO и pWW0 мы оспариваем, что для некоторых рекомбинантных плазмид увеличение времени генерации штаммов микроорганизмов, содержащих эти плазмиды, связано не просто с присутствием плазмид в бактериальной клетке, а, скорее всего, с высоким уровнем экспрессии клонированных в плазмиде генов. Более того, мы экспериментально показали, что снижение скорости роста популяции плазмидсодержащего штамма прямо пропорционально эффективности экспрессии клонированного в плазмиде гена *gfp* (глава 4) и используя опубликованные данные (Duetz and van Andel, 1991) аналогичную зависимость для генов мета-пути (catechol 2,3-dioxygenase) плазмиды pWW0. С другой стороны, проблема еще усложняется тем, что часто направленное культивирование и отбор плазмидсодержащих микроорганизмов ведет к повышению их приспособленности, иногда даже более приспособленных, чем исходный бесплазмидный вариант (Bouma and Lenski, 1988; Fleming et al., 1988; Jones et al., 1980; Lenski, 1993; Lenski et al., 1994a; McDermott et al., 1993; Papadopoulos et al., 1999; Seegers et al., 1995). В простом же случае, в неселективных для поддержания плазмид условиях удельная скорость роста популяции плазмидсодержащих микроорганизмов скорее всего представляет убывающую функцию копияности, полиномиальную либо экспоненциальную (в зависимости от условий, Ганусов и др., 2000).

$$\mu_i \sim 1 - \beta i^m \quad \text{или} \quad \exp(-\beta i). \quad (2.1.6)$$

В селективных же условиях, когда рост бактерий ограничивается, например, антибиотиком, удельная скорость роста вероятно пропорциональна копияности при малом числе копий и является насыщающейся (либо убывающейся) функцией при высокой копияности (Ганусов и др., 2000; Ганусов и др., 2001), т.е.

$$\mu_i \sim \mu \frac{i}{K + i^m}. \quad (2.1.7)$$

Хотелось бы еще раз подчеркнуть, что экспериментальных исследований, связывающих удельную скорость роста микробной популяций и среднего числа копий в клетках, до сих пор проведено не было, соответственно, при разработке математических моделей, где копияность плазмиды представляет существенную переменную, приходится

руководствоваться “здравым смыслом”, нежели реальными экспериментальными данными.

3. Вероятность дорепликации i плазмид в клетке до j плазмид за время клеточного деления $\lambda(i \rightarrow j)$. Для подробного вывода явного вида этой функции необходимо привлечение двух составляющих: знание основных механизмов регуляции контроля копийности плазмид в бактериальных клетках и принципов стохастического моделирования основанного на подходе “главное уравнение или просто M-уравнение” (Master equation approach, см. (Kampen, 1981)), который в теории вероятностей соответствует марковским сетям с дискретным пространством состояний и непрерывным временем (Chiang, 1980). Так как в дальнейшем мы будем рассматривать динамику многокопийных плазмид pBR322 и pPHL-7 (и подобных), в основе которых лежит механизм контроля копийности плазмиды ColE1, мы основываем описание функции $\lambda(i \rightarrow j)$ на известной биологии регуляции копийности этой плазмиды (см. предыдущую главу). Как было описано в главе 1, в репликации плазмиды ColE1 принимает участие два основных компонента: *cis*- действующий препраймер (“затравка”) для ДНК полимеразы RNAII и *trans*- действующий комплиментарный к RNAII транскрипт RNAI (Masukata and Tomizawa, 1986; Tomizawa, 1985; Tomizawa et al., 1981; Tomizawa and Som, 1984). RNAI и RNAII способны образовывать комплиментарный комплекс, который препятствует успешному образованию полноценного праймера для ДНК полимеразы и, соответственно, началу репликации плазмиды, если комплекс RNAI-RNAII образуется в так называемом “окне ингибирования” (Tomizawa, 1984; Tomizawa, 1986; Tomizawa et al., 1981). Стабильность образованного комплекса многократно увеличивается в присутствии продукта гена *rom*, также находящегося на плазмиде (Summers, 1996; Tomizawa, 1990a; Tomizawa and Som, 1984). Следовательно увеличение концентрации RNAI приводит к снижению вероятности образования полноценного праймера, и, соответственно, к снижению скорости репликации плазмид. С другой стороны, усиление промоторной активности гена RNAII влечет увеличение скорости репликации плазмид. Так как концентрации матричных RNAI и RNAII составляют несколько десятков (для RNAII) и сотен (для RNAI) молекул на клетку (Brendel and Perelson, 1993; Brenner and Tomizawa, 1991), динамический процесс образования затравки, взаимодействие между RNAII и комплиментарной RNA I, и, наконец, репликация плазмид являются случайным, а, следовательно, с наилучшим приближением должен быть описан стохастической моделью (Ehrenberg and Sverredal, 1995; Kampen, 1981; Paulsson and Ehrenberg, 1998). Такая модель должна описывать изменение копийности в отдельно взятой клетке с

течением времени. Пусть $p(x,t)dt$ - вероятность нахождения “ x ” копий плазмиды ($x = 1, 2, \dots, \infty$) в произвольной бактериальной клетке в интервал времени $(t, t + dt)$. Тогда изменение $p(x,t)$ подчиняется уравнению (Ehrenberg, 1996; Ehrenberg and Sverredal, 1995; Paulsson and Ehrenberg, 1998):

$$\dot{p}(x,t) = \rho k_{II} (x-1) Q(R(x-1)) p(x-1,t) - \rho k_{II} x Q(R(x)) p(x,t), \quad (2.1.8)$$

где k_{II} - скорость инициации транскрипции с промотора RNAII (час⁻¹); $Q(R)$ - вероятность образования полноценного праймера при концентрации RNAI = R ; ρ - вероятность репликации плазмиды при условии, что полноценный праймер для ДНК полимеразы успешно образовался (Ehrenberg, 1996; Paulsson and Ehrenberg, 1998; Paulsson et al., 1998; Tomizawa, 1986). Очевидно, что зависимость $Q(R)$ при заданной концентрации ингибиторной молекулы R определяет дальнейшую динамику системы (2.1.8), также как и концентрация антисенсной RNAI R , зависящая от текущего числа копий плазмиды в клетке x . Можно сделать два основных предположения относительно биологии контроля копийности плазмиды ColE1. Во-первых, учитывая высокую скорость оборота mRNA в бактериальных клетках и *trans*- действующую RNAI в частности (Brenner and Tomizawa, 1991; Paulsson and Ehrenberg, 1998; Summers, 1996), мы находим, что концентрация RNAI пропорциональна числу копий на клетку или $R = k_I / \varepsilon_I x$ (Paulsson et al., 1998)². Во-вторых, зависимость $Q(R)$, согласно анализу проведенному в главе 1 (Ehrenberg, 1996; Paulsson et al., 1998) и некоторым экспериментальным данным предполагается двух основных видов: гиперболической либо экспоненциальной (Brendel and Perelson, 1993; Brenner and Tomizawa, 1991; Ehrenberg, 1996; Nordstrom, 1983; Nordstrom et al., 1984; Paulsson et al., 1998), или математически $Q(R) = \frac{1}{1 + R/k}$ в случае гиперболической зависимости (выражение (1.3.3)) и $Q(R) = \exp(-R/k)$ в случае экспоненциальной (выражение (1.3.4)). С учетом этих предположений математическая модель (2.1.8) переписывается в виде:

² $\dot{R} = k_I x - \varepsilon_I R$ что в приближении $k_I, \varepsilon_I \rightarrow \infty$ при $k_I / \varepsilon_I = \text{const}$ дает $R = k_I / \varepsilon_I x$

$$\dot{p}(x,t) = \frac{\rho k_{II}(x-1)}{(1+(x-1)/mK)^m} p(x-1,t) - \frac{\rho k_{II}x}{(1+x/mK)^m} p(x,t), \quad (2.1.9)$$

где $m=1$ соответствует гиперболическому механизму ингибирования, $m=\infty$ - экспоненциальному. К сожалению, нелинейный вид зависимости коэффициентов модели (2.1.9) от числа копий плазмиды x не позволяет найти ее точное аналитическое решение, а следовательно численное решение будет использовано при дальнейшем анализе, если обратное не обозначено. Тем не менее, один важный и интересный случай все же может быть проанализирован аналитически, хотя и в приближенном варианте. Положим $m=1$ и предположим, что $x \gg 1$, тогда процесс репликации плазмид, описанный системой уравнений (2.1.9), приближенно является Пуассоновским:

$$\dot{p}(x,t) = \rho k_{II} K p(x-1,t) - \rho k_{II} K p(x,t),$$

и его решение дается следующим выражением (распределением Пуассона):

$$p(x,t) = \begin{cases} 0, & \text{if } x < x_0 \\ \frac{n^{x-x_0}}{(x-x_0)!} \exp(-n), & \text{if } x \geq x_0 \end{cases} \quad (2.1.10)$$

где $n = \rho k_{II} K t$ с начальным условием $p(x,0) = \delta_{x x_0}$, где δ_{ij} - символ Кронекера. Распределение плазмид к окончанию клеточного цикла и подготовке к делению получается при замене $t \rightarrow t_{gen}$, что и представляет искомую функцию $\lambda(i \rightarrow j)$.

$$\lambda(i \rightarrow j) = \frac{n^{j-i_0}}{(j-i)!} \exp(-n), \quad 2.1.11$$

где n теперь обозначает среднее число репликаций плазмиды за клеточный цикл клетки-хозяина. В случае экспоненциального ингибирования функция $\lambda(i \rightarrow j)$ находится численным интегрированием системы уравнений (2.1.9) при $m \rightarrow \infty$.

Выражение (2.1.10) было впервые эмпирически предложено в работе (Nordstrom and Aagaard-Hansen, 1984; Nordstrom et al., 1984), а затем получено и использовано в ряде тео-

ретических работ для описания контроля копийности плазмид R1 и ColE1 (Brendel and Perelson, 1993; Ehrenberg and Sverredal, 1995; Keasling and Palsson, 1989; Paulsson and Ehrenberg, 1998; Rosenfeld and Grover, 1993a). Их подробный анализ проведен во введении (см. главу 1), а здесь мы только еще раз подчеркнем, что решение (2.1.10) получено только в частном случае с использованием приближения “большой копийности” $x \gg 1$. В общем же случае решение системы (2.1.9), означающее вероятность наблюдения x копий плазмиды в определенной клетке в момент времени t , прошедшее после деления, может быть найдено только с использованием численных методов. Таким образом, математическое описание негативного контроля копийности плазмид (или, другими словами, функции перерепликации плазмид) завершает формулирование точной математической модели популяционной динамики плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов.

Применение модели. После столь длительного и детального описания всех особенностей основной модели, может возникнуть вполне закономерный вопрос: “А зачем все это нужно? Где и как эта модель может быть применена?” При всей наивности этих вопросов они часто оказываются роковыми в теоретических исследованиях, где математическая красота и строгость разработанной модели являются привлекательными, но практическая ценность модели для понимания биологии изучаемого явления часто оказывается ничтожной. С этой стороны, разработанная точная модель (2.1.3) обладает рядом несомненных преимуществ и одним существенным недостатком. Во-первых, эта модель позволяет предсказать динамику потери (или поддержания) плазмид, динамику распределения и стационарные распределения клеток с различной копийностью, если условия культивирования (селективные или неселективные), параметры плазмиды (контроль копийности, случайная/точная сегрегация) и содержащего ее штамма (удельная скорость роста) известны (или обратная задача - по известной динамике определить параметры плазмиды и бактериального штамма - см. главу 4). Во-вторых, модель может быть использована для ответа на теоретические вопросы типа “что если ?” (копийность плазмиды изменилась, уровень экспрессии плазмидных генов увеличился и т.п.). Так как экспериментальное исследование этих вопросов часто сопряжено с рядом трудностей (Summers, 1996), применение математических моделей является более чем оправданным.

С другой стороны, математическая модель (2.1.3), описанная в этой части, является достаточно сложной для аналитического анализа (в случае гиперболического ингибирования ситуация гораздо проще из-за аналитического приближения для функции $\lambda(i \rightarrow j)$, см. выражение (2.1.11)), хотя и процессы, заложенные в нее (репликация и сегрегация

плазмид), являются весьма простыми. Следующая часть как раз и посвящена описанию и анализу приближенной модели динамики плазмид, которая включает в себя основные свойства репликации плазмид и их распределения по дочерним клеткам при делении, которая не является точной, но тем не менее, которая позволяет провести сравнительный анализ особенностей динамики многокопийных бактериальных штаммов при различных условиях культивирования.

Хотя и математическое описание всех функций было проведено достаточно подробно, не совсем понятно, во-первых, как механизм ингибирования репликации плазмид (экспоненциальный или гиперболический) влияет на вероятность того, что при наличии в клетке, например, 5 копий плазмиды к концу клеточного цикла в клетке останется 5 копий (или будет 6, 7 и т.д. копий). Во-вторых, как стационарное (квази-стационарное, если быть точным) распределение клеток с различным числом копий плазмиды зависит от механизма распределения плазмид по дочерним клеткам (случайное или точное)? Эти вопросы, также как и вопрос стабильности плазмидсодержащих клеток при разном характере сегрегации плазмид, могут быть с легкостью отвечены с помощью математической модели (2.1.3) (стабильность плазмид при различных механизмах их наследования была частично проанализирована в недавней работе (Paulsson and Ehrenberg, 1998), и соответственно здесь не будет анализироваться подробно (см. также главу 3)).

Как показывает численный анализ, вероятность репликации $k = j - i$ плазмид в течение клеточного цикла радикальным образом зависит от механизма ингибирования пре-прайма RNAPII антисенсной RNAI (см. рис. 2.1.2). В случае гиперболического ингибирования, распределение вероятности $\lambda(\cdot \rightarrow i)$ не зависит от количества копий плазмиды в начале репликации и, в хорошем приближении, от параметра $\theta = \rho k_{II} / D$. Эти свойства гиперболического механизма ингибирования и легли в основу так называемой модели “+n репликаций” (Nordstrom et al., 1984; Persson et al., 1990a; Persson et al., 1990b), которая только в последнее время получила теоретическое обоснование (Ehrenberg, 1996; Paulsson and Ehrenberg, 1998). Экспоненциальное ингибирование, с другой стороны, демонстрирует противоположное поведение: при большой начальной концентрации плазмидной ДНК в клетке вероятность того, что ни одной плазмиды не будет прореплицировано может быть достаточно большой; более того, вероятность $\lambda(\cdot \rightarrow i)$ драматически зависит от эффективности репликации плазмид θ , переходя в дельта функцию при больших θ (не показано).

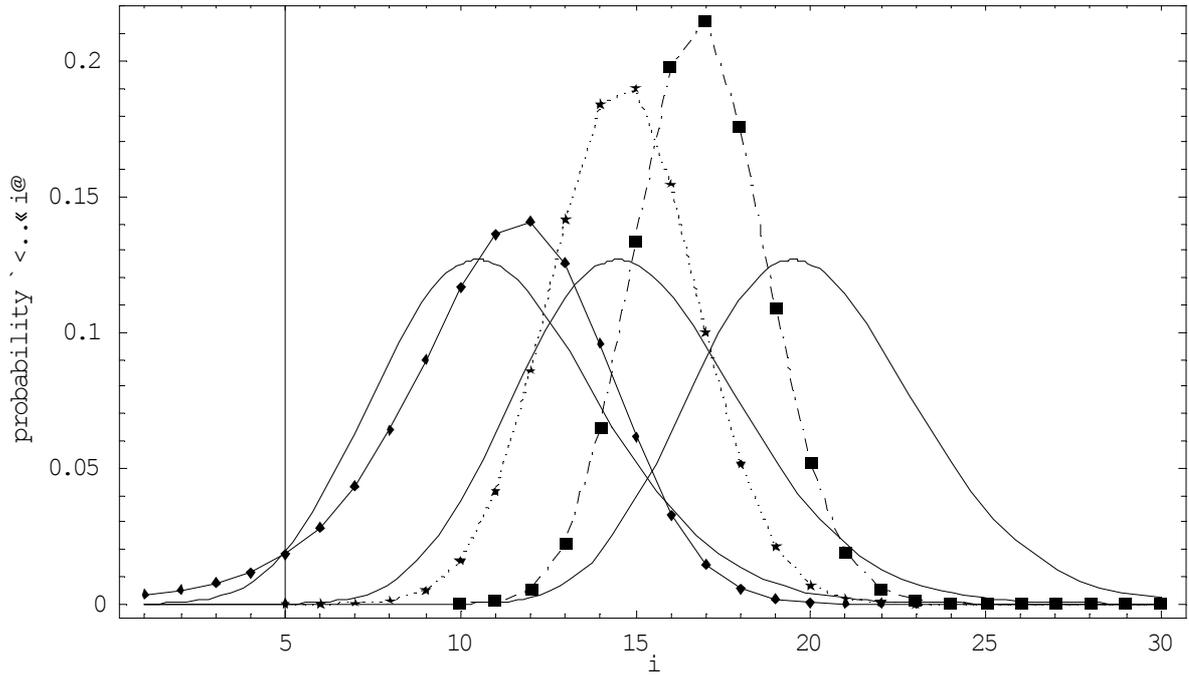


Рис 2.1.2. Вероятность нахождения i копий плазмиды в клетке в конце клеточного цикла, при наличии 1 (ромб), 5 (звезда) или 10 (квадрат) копий плазмиды в начале процесса репликации. Точки соответствуют вероятности $\lambda(\cdot \rightarrow i)$ в случае экспоненциального ингибирования, непрерывные кривые - гиперболического (которое дается распределением Пуассона). Параметры модели: $\theta = \rho k_{II} / D = 10$, $D = 0.25$ час⁻¹, среднее число репликаций плазмиды в распределении Пуассона n положено равное 10, $K = \frac{n}{m(\frac{n}{\theta} - 1)}$. Расчеты в соответствии с моделью (2.1.9) при $m = 1$ (гиперболическое ингибирование) и $m = \infty$ (экспоненциальное ингибирование).

Такая точность работы экспоненциального механизма ингибирования отражается прежде всего на стабильности плазмид (Paulsson and Ehrenberg, 1998). Так как потеря копий плазмиды осуществляется через образование бесплазмидной клетки при делении плазмиднесущей материнской клетки, экспоненциальное ингибирование, выравнивая число копий в популяции к завершению репликации хромосомальной ДНК, обеспечивает гораздо меньшую вероятность образования бесплазмидной клетки по сравнению с гиперболическим механизмом ингибирования, который при равном среднем числе копий, приводит к более дисперсному распределению, а следовательно, к большей вероятности образования бесплазмидной клетки при последующем делении (Paulsson and Ehrenberg, 1998; Summers, 1996).

Таким образом, эти простые решения демонстрируют интересную разницу в регуляции контроля копийности, и соответственно, в стабильности поддержания, плазмид с экс-

пониженным (предположительно ColE1) и гиперболическим (предположительно R1) механизмами ингибирования репликации плазмид.

В отличие от приближенной модели, которая будет сформулирована и проанализирована в последующих частях, точная модель (2.1.3) также позволяет исследовать вопрос, как стационарное распределение клеток с различной копийностью зависит от механизма сегрегации плазмид между дочерними клетками при делении материнской. Простейшая аргументация показывает, что при точном распределении плазмид по дочерним клеткам, распределение клеток с разным числом копий плазмиды должно быть менее дисперсным по сравнению со случайным механизмом распределения. Это теоретическое предсказание, полученное численным решением системы (2.1.3), изображено на рис. 2.1.3.

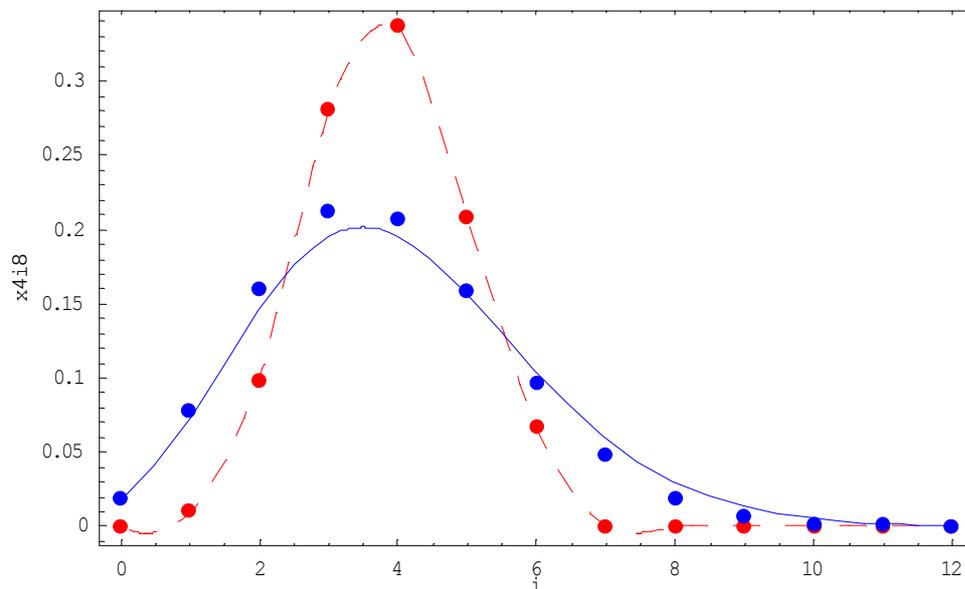


Рис. 2.1.3. Квази-стационарное распределение клеток с различной копийностью при случайной (синие точки, непрерывная линия) и точном (красные точки, штриховая линия) сегрегации плазмид при делении. Непрерывная (сплошная) кривая описывает теоретически ожидаемое распределение в приближении “большой копийности” (распределение Пуассона). Расчеты в соответствии с моделью (2.1.3) с использованием параметров: $D=0.25 \text{ час}^{-1}$, $n = 4$, $\theta = 10$, $K = n/(\theta - 1)$, $K_S = 0.01$, $S_0 = 10$, $\mu_{\max} = 1 \text{ час}^{-1}$, $m = 1$ (гиперболический механизм ингибирования).

Действительно, квази-стационарное распределение (“квази”, потому что с течением времени плазмиды будут все равно потеряны в популяции в неселективных для поддержания плазмид условиях (см. выражение (1.2.3) и главу 3)) обладает большей дисперсией при случайном распределении, чем при точном, как и ожидалось. Хотелось бы также отметить, что стационарное распределение (штриховая линия на рис. 2.1.3) совпадает с ра-

нее рассчитанным для плазмиды R1 в симуляционных (Монте-Карло) численных экспериментах (Nordstrom, 1985; Nordstrom and Aagaard-Hansen, 1984; Nordstrom et al., 1984).

Таким образом, точная модель (2.1.3) действительно описывает биологически корректную ситуацию динамики плазмид в популяции бактерий, следовательно, может быть использована для предсказания динамики плазмидсодержащих микроорганизмов при различных условиях культивирования, а также для сравнения с динамикой приближенной модели, которая будет разработана в следующей части.

2.2. Приближенная математическая модель популяционной динамики плазмид.

Точная модель популяционной динамики плазмид, которая было описана в предыдущей части, не является вполне удобной для проведения аналитического анализа и, в некоторой степени, сложна для понимания. В этой части мы разработаем альтернативную модель популяционной динамики плазмидсодержащих микроорганизмов, к которой предыдущая точная модель может быть сведена в некотором приближении, и которая позволит нам понять динамику бактериальных плазмид (на примере плазмид pBR322, pPHL-7, pGLO и других) в селективных и неселективных условиях. Однако необходимо отметить, что даже если модель и является приближенной, она должна содержать основные свойства плазмид, как молекулярные, так и популяционные. Рассмотрим популяционные аспекты динамики плазмиднесущих микроорганизмов.

Как было упомянуто во введение (глава 1), популяционная неустойчивость штаммов микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды, может быть обусловлена тремя основными причинами (Бейли 1989; Вельков 1983, 1994; Боронин и др. 1983, Дебабов 1985, 1987; Печуркин и др., 1990, Ганусов и др. 1999, Ганусов и Брильков, 1999): 1) сегрегацией плазмид, когда часть клеток популяции утрачивает плазмиды при делении; 2) нестабильностью генетической структуры плазмид, при которой плазмиды сохраняются во всех клетках, но в измененном виде; 3) отличием кинетических характеристик роста популяции штамма, содержащего активно функционирующие плазмиды, в сравнении с аналогичными у бесплазмидного варианта, либо у варианта, содержащего измененные плазмиды. Следовательно, любая математическая модель, описывающая динамику нестабильных рекомбинантных штаммов, должна содержать перечисленные выше свойства.

Рассмотрим динамику популяции микроорганизмов (для начала не обязательно плазмидсодержащих) при непрерывном культивировании в хемостате. Предполагая пространственную гомогенность популяции бактерий и питающего их субстрата, изменение численности микроорганизмов F и ресурса S подчиняется следующей системе дифференциальных уравнений (Herbert et al., 1965; Moser, 1958; Novick and Szilard, 1950; Pirt, 1975):

$$\begin{cases} \frac{dF}{dt} = [\mu(S) - D]F, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu(S)F}{y}, \end{cases} \quad (2.2.1)$$

где $\mu(S)$ - удельная скорость роста популяции микроорганизмов, D - удельная скорость разбавления среды в хемостате и F - плотность популяции микроорганизмов.

Предположим теперь, что клетки (особи) популяции распределены по каким-либо признакам, например, по возрасту, размеру или числу копий некоторой плазмиды. Тогда функция $F = F(\bar{x}, t)$ теперь имеет смысл плотности вероятности так, что

$F(\bar{x}, t) d\bar{x} / \int_0^{\infty} F(\bar{x}, t) d\bar{x}$ - есть вероятность обнаружения клетки с относительной копийно-

стью, принадлежащей интервалу $(\bar{x}, \bar{x} + d\bar{x})$, где \bar{x} - относительное содержание плазмидной ДНК в клетке. В этом случае, так как F является функцией как минимум двух переменных, уравнение (2.2.1) должно быть переписано в частных производных (Ганусов и др., 1999; Ганусов и Брильков, 1999; Ганусов и др., 2001; Ландау и Лифшиц, 1973; Климонтович, 1982).

Для вывода основной модели в частных производных выпишем закон сохранения числа клеток для некоторой произвольной области фазового пространства $dV = d^n \bar{x}$ ("фазовое пространство" в этом контексте означает наличие нескольких (n) различных плазмид с разной копийностью). При выводе также необходимо учесть, что кроме потока через границы, вызванного изменением копийности клеток со временем, существуют процессы рождения и элиминации клеток, которые можно рассматривать как источники- $\mu(\bar{x}, S)$ и стоки- D , распределенные по всей рассматриваемой области V . К моменту времени t в рассматриваемом объеме фазового пространства V будет $\int_V F d^n \bar{x}$ клеток. Рожде-

ние и элиминация даются следующим интегралом: $\int_0^t \int_V [\mu(\bar{x}, S) - D] d^n \bar{x} dt$. Дифференцируя

эти выражения по t , для любого момента времени получаем закон сохранения полного числа бактериальных клеток (Ландау и Лифшиц, 1973):

$$\frac{d}{dt} \int_V F d^n \bar{x} = \int_V [\mu(\bar{x}, S) - D] d^n \bar{x}.$$

Перенос операции дифференцирования под знак интеграла дает следующий закон:

$$\int_V \frac{\partial F}{\partial t} d^n \bar{x} + \oint_S (F\vec{v}) d\vec{s} = \int_V [\mu(\bar{x}, S) - D] d^n \bar{x},$$

где $\vec{v} = \vec{v}[x, t]$ - скорость передачи плазмид в популяции от варианта \bar{x} варианту $\bar{x} + d^n \bar{x}$. Пользуясь теоремой Гаусса-Остроградского (Ландау и Лифшиц, 1973), производя стандартные операции и учитывая произвольность области V , мы получаем:

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \text{div}(\dot{\bar{x}}F) = [\mu(x, S) - D]F,$$

где $\text{div}(\vec{v}) = \frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z}$ - дивергенция вектора \vec{v} .

Вместе с уравнением на субстрат в случае хемостатного культивирования общая математическая модель, описывающая динамику распределения плазмид в клетках микроорганизмов, имеет следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{\partial F}{\partial t} + \text{div}(\dot{\bar{x}}F) = [\mu(\bar{x}, S) - D]F, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \int_0^\infty \frac{\mu(\bar{x}, S)F(\bar{x}, t)}{Y(\bar{x}, S)} d^n \bar{x}. \end{cases} \quad (2.2.2)$$

где $F(\bar{x}, t)$ - плотность клеток с относительной концентрацией “ \bar{x} ” плазмидной ДНК, S - концентрация субстрата в ферментере, $\mu(\bar{x}, S)$ - удельная скорость роста, D - удельная скорость разбавления среды в хемостате, S_0 - концентрация субстрата в питающем резервуаре, $y(\bar{x}, S)$ - экономический коэффициент.

Таким образом, используя этот подход (2.2.2) и описывая разными способами функции $\vec{v} = \vec{v}[x, t]$, $\mu(\bar{x}, S)$, $y(\bar{x}, S)$, $\varepsilon(\bar{x}, S)$ (эффективность экспрессии клонированных генов, которая входит в удельную скорость роста, см. далее и главу 4), можно исследовать различные свойства многокопийных, многоплазмидных бактериальных клеток.

Однако необходимо отметить, что хотя и сформулированный подход и основанная на нем математическая модель позволяют исследовать особенности динамики *разных* плазмид с учетом их несовместимости, популяционная динамика плазмиднесущих микроорганизмов, содержащих плазмиды только одного типа (например, pBR322, R1, ColE1, pGLO, RP1-RP4, F), изучена к настоящему времени достаточно подробно, хотя многие вопросы так и остаются неотвеченными (Bremer and Lin-Chao, 1986; Summers, 1996). Руководствуясь этими соображениями, дальнейший анализ математической модели (2.2.2) и ее производных будет проведен в предположении, что исследуемый микроорганизм содержит плазмиду одного типа (например, pBR322 или pGLO).

Как подход (2.2.2) показывает, для формулирования математической модели необходимо знание двух основных функций: $\bar{v} = \bar{v}[x, t]$ и $\mu = \mu[x, S]$. Тогда как удельная скорость роста μ определяется условиями культивирования (селективные/неселективные) с естественным добавлением функции Моно как зависимости скорости роста микробной популяции от концентрации субстрата (Herbert et al., 1965; Monod, 1949), скорость передачи плазмид от варианта x к варианту $x+dx$ (или от $i \rightarrow i+1$) должна учитывать следующие процессы: увеличение копийности плазмиды из-за ее репликации и снижение концентрации плазмиды из-за ее потери при делении (разбавление) (Nordstrom et al., 1984; Paulsson et al., 1998; Summers, 1991; Summers, 1996; Summers et al., 1993). Механизм “перепликации” плазмид зависит от биологии контроля репликации конкретной плазмиды и в общем случае описывается функцией $\lambda(x)$, которая в некотором смысле связана с функцией $\lambda(i \rightarrow j)$ в точной модели. Потеря плазмид при делении из-за их разбавления в среднем пропорциональна числу плазмид на клетку и обратно пропорциональна времени генерации клеток микроорганизмов. Определяя, относительную копийность как $x = \frac{i}{N}$, где i - реальное число копий плазмиды на клетку и N - максимально возможное количество копий в клетке (которое в частности может быть и бесконечным), скорость передачи плазмид от варианта x к варианту $x+dx$ (или от $i/N \rightarrow i/N + 1/N$) принимает вид:

$$\dot{x} = v = \lambda(x) - \tau\mu(x, S)x, \quad (2.2.3)$$

где τ - параметр, определяющий скорость уменьшения среднего числа копий на клетку в популяции микроорганизмов (см. главу 3).

Подставляя уравнение (2.2.3) в систему (2.2.2) можно получить математическую мо-

дель, учитывающую сегрегационную и кинетическую нестабильность рекомбинантных штаммов микроорганизмов в случае культивирования в хемостате (Ганусов и др., 2001):

$$\begin{cases} \frac{\partial F(x, t)}{\partial t} = (\mu(x, S) - D)F(x, t) - \frac{\partial}{\partial x} F(x, t) [\lambda(x) - \tau x \cdot \mu(x, S)], \\ \frac{\partial F(0, t)}{\partial t} = (\mu(0, S) - D)F(0, t) - [\lambda'(0) - \tau \mu(0, S)]F(0, t) + \int_0^{\infty} \tau_0(x) \mu(x, S) F(x, t) dx, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu(x, S) F(x, t)}{y(x, S)} dx, \end{cases} \quad (2.2.4)$$

где $\tau_0(x)$ описывает вероятность образования бесплазмидной клетки при делении плазмидной с копийностью x , $\rho = di/dx$ - плотность состояний (в линейном случае $\rho = N$). Выражение (2.2.4) является финальной математической моделью, описывающей популяционную динамику плазмидсодержащих микроорганизмов, содержащих сегрегационно ($\tau_0 \neq 0$) и кинетически $\mu(x, S) \neq \text{const}$ нестабильные природные и рекомбинантные плазмиды.

В большинстве случаев анализ непрерывных моделей проводится гораздо проще и более того, более элегантно (см., например, сравнительный анализ непрерывных и дискретных моделей (May and Nowak, 1994; May and Nowak, 1995)), поэтому модель (2.2.4) предпочтительна хотя бы с этой стороны. Тем не менее, приближение “непрерывной копийности” может быть не совсем точным, особенно для плазмид с малой копийностью (low copy number plasmids), и соответственно, предсказания непрерывной модели могут быть не совсем корректными. С другой стороны, модель (2.2.4) также позволяет не только “сконструировать” дискретную модель, описывающую аналогичную динамику плазмид, в реальных “координатах” (число копий плазмиды на клетку), но и понять физический (и биологический) смысл обеих моделей.

Пусть X_i - концентрация клеток с количеством копий плазмиды “ i ”. Тогда динамика под-популяции клеток с копийностью i описывается разностной схемой модели (2.2.4) по фазовой координате “ x ” (Ганусов и др., 2000):

$$\begin{cases}
\frac{dX_0}{dt} = (\mu_0(S) - D)X_0 + \tau\mu_1(S)X_1 + \sum_{i=1}^N \tau_0(i)\mu_i(S)X_i, \\
\dots\dots\dots \\
\frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S) - D)X_i - \tau i\mu_i(S)X_i + \tau(i+1)\mu_{i+1}(S)X_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \\
X_{N+1} = 0, \\
\dots\dots\dots \\
\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \sum_{i=0}^N \frac{\mu_i(S)X_i}{Y_i},
\end{cases} \quad (2.2.5)$$

где X_i - концентрация клеток с “ i ” копиями плазмиды, а условие $X_{N+1} = 0$ следует из максимальнойности копий плазмиды в клетке.

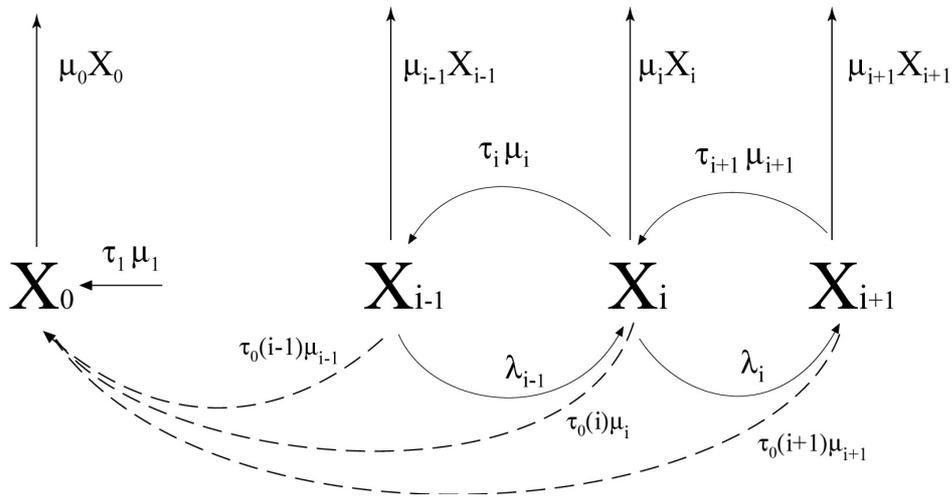


Рис. 2.2.1. Основные популяционные процессы, описанные в моделях (2.2.4 - 2.2.5) и подходе (2.2.2). X_i - число клеток с числом копий плазмиды i в популяции плазмидсодержащего штамма, τ_i описывает снижение копийности из-за “разбавления” плазмид при делении, $\tau_0(i) \approx 2^{1-i}$ - вероятность образования бесплазмидной клетки при делении клетки с i копиями плазмиды, λ_i - скорость репликации плазмид из-за контроля копийности, стрелки в верхней части обозначают рост клеток с различной копийностью (и соответственно с разными скоростями).

Простейший анализ модели (2.2.5) раскрывает простой физический смысл динамики плазмидсодержащих клеток в непрерывной модели (2.2.4) (и в подходе (2.2.2)). Изменение копийности в популяции микроорганизмов (снижение за счет потери и увеличение за счет репликации) может быть описана схемой, изображенной на рис. 2.2.1. Как последующий анализ показывает (см. главу 3), все параметры, изображенные на рис. 2.2.1, имеют простой

биологический смысл и могут быть с легкостью сопоставлены с параметрами точной модели, разработанной в предыдущей части. Например, $\tau_i = \tau \cdot i$, $\tau_0(i) \approx 2^{1-i}$, тогда как λ_i зависит от точности контроля копияности (гиперболический $\lambda_i = \tau \lambda_0 K$ и экспоненциальный $\lambda_i = \tau \lambda_0 i \exp(-i/K)$), где $\lambda_0 = \rho k_{II}$ и $K = \varepsilon_I / (k_I - k_{II})$, подробное объяснение дано в главе 3).

В заключении этой части мы проведем простейший анализ приближенной непрерывной модели (2.2.4) с использованием различных аппроксимаций. Во-первых, мы обобщим непрерывный подход (2.2.2) на случай совместной динамики нескольких плазмид в популяции микроорганизмов. Во-вторых, мы проанализируем динамику плазмидсодержащих клеток в приближении экспоненциального роста (или роста, близкого к стационарному в непрерывной культуре); в завершении мы рассмотрим стационарные распределения клеток с различной копияностью в популяции микроорганизмов и их зависимость от селективности условий культивирования.

Общий подход к исследованию свойств популяционной динамики многокопийных многоплазмидных плазмид микроорганизмов. Математическая модель (2.2.4) с легкостью может быть обобщена для моделирования динамики многоплазмидных (т.е. содержащих несколько *различных* плазмид) рекомбинантных штаммов микроорганизмов и изучения связанных с этим новым обобщением свойств, например несовместимости разных плазмид в одной клетке. Для этого необходимо 2 основных шага (Ганусов и др., 1999; Ганусов и Брильков, 1999; Ганусов и др., 2000). Первое, это сформировать вектор потока плазмид в популяции:

$$\vec{R} = (x_1 \quad x_2 \quad \bullet \quad \bullet \quad x_j), \quad (2.2.6)$$

где x_1 - относительная концентрация плазмид типа 1, x_2 - относительная концентрация плазмид типа 2 и т.д. Под типом можно понимают либо разные, либо структурно измененные плазмиды. Второе, это описать взаимоотношения между классами плазмид, т.е. совместимость/несовместимость, сегрегационную и структурную нестабильность и др.:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx_1}{dt} = f_1(x_1, x_2, \dots, x_j), \\ \frac{dx_2}{dt} = f_2(x_1, x_2, \dots, x_j), \\ \dots \\ \frac{dx_j}{dt} = f_j(x_1, x_2, \dots, x_j), \end{array} \right. \Rightarrow \frac{d\vec{R}}{dt} = \vec{f}(x_1, x_2, \dots, x_j), \quad (2.2.7)$$

Используя уравнение (2.2.7) и основной подход (2.2.2) мы окончательно находим уравнение, описывающее динамику многоплазмидного штамма:

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \sum_{i=1}^j f_i \cdot \frac{\partial F}{\partial x_i} = \left[\mu(\vec{R}, S) - D - \sum_{i=1}^j \frac{\partial f_i}{\partial x_i} \right] \cdot F \quad (2.2.8)$$

В завершенной форме уравнение (2.2.8) должно быть дополнено уравнением на лимитирующий рост субстрат. Решение системы (2.2.8) при различных условиях культивирования позволит исследовать особенности поддержания плазмид в популяции микроорганизмов с возможностью сосуществования (хотя возможно и не длительного) нескольких плазмид в бактериальных клетках.

Rem. Подобный подход к моделированию динамики численности биологических популяций, основанный на распределенных моделях и уравнении непрерывности, нельзя признать новым, т.к. он использовался ранее рядом исследователей для описания распределения организмов по некоторым признакам, например, возрасту или размерам (Anderson et al., 2000; Свирежев, 1978; Полуэктов, 1974; Степанова, 1980; Свирежев и Пасеков, 1974). Подход, предложенный в настоящей работе и основанная на нем математическая модель, позволяют описывать популяционную динамику нестабильных плазмид многокопийных многоплазмидных штаммов микроорганизмов, в том числе с учетом несовместимости различных плазмид в одной клетке, что ранее не было рассмотрено (см., например, работы в этом направлении: Апонин, 1982; Апонин и др., 1984; Апонина и др., 1984; Апонин и Апонина, 1996; Mongold, 1992).

Динамика распределений в математической модели. В этой части мы рассмотрим динамику распределения клеток с различной копийностью в популяции рекомбинантного штамма при непрерывном и периодическом культивировании (Ганусов и др., 2001). Для упрощения анализа мы используем приближение, что в начале культивирования средняя

копийность на клетку является очень большой (это, например, возможно достичь хлорафеминиколом (Frenkel and Bremer, 1986) или манипуляцией скорости роста плазмиднесущих клеток (Atlung et al., 1999; Lin-Chao and Bremer, 1986; Summers, 1996)), а теоретическое значение средней копииности в новых условиях (после установления стационарного состояния по числу копий, которое определяется из уравнения (2.2.3) при $\dot{x} = 0$) является достаточно малым (см., например, (Lin-Chao and Bremer, 1986)). В этой аппроксимации, мы можем пренебречь двумя функциями $\tau_0(x)$ и $\lambda(x)$ в модели (2.2.4). Так как копииность в начале культивирования предполагается достаточно большой, мы также не будем учитывать динамику бесплазмидных клеток (уравнение 2 в (2.2.4)). Как снятие этих ограничений повлияет на общность наших выводов мы обсудим в окончании этой главы.

Для получения модели в наиболее простой форме мы предлагаем провести следующую замену переменных:

$$\begin{aligned} v &= D/\mu_{max}, \quad \sigma = S/K_S, \quad \sigma_0 = S_0/K_S, \quad t = t \cdot \mu_{max}, \\ \mu &= \mu(x, \sigma) = \mu_\sigma \mu_x = \sigma/(1+\sigma) \cdot \mu_x, \quad \Psi = F/(K_S y_0), \end{aligned} \quad (2.2.9)$$

после которой получаем модель (2.2.4) в безразмерном виде:

$$\begin{cases} \frac{\partial \Psi}{\partial t} = (\mu_\sigma \mu_x - v) \Psi + \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_\sigma \mu_x \cdot \Psi) \\ \frac{d\sigma}{dt} = v[\sigma_0 - \sigma] - \mu_\sigma \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu_x \Psi}{y} dx \end{cases} \quad (2.2.10)$$

Так как полная модель (2.1.10) в общем случае аналитически не интегрируема, мы получим несколько аналитических решений $\Psi(x, t)$ в приближении роста популяции в хемотростате (турбидостате или периодике) в состоянии, близком к стационарному. При этом μ_σ не зависит от концентрации субстрата, $\mu \approx v$ и система (2.2.10) сводится к следующей:

$$\begin{cases} \frac{\partial \Psi}{\partial t} = \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_\sigma \mu_x \cdot \Psi) \\ \frac{d\sigma}{dt} = v(\sigma_0 - \sigma) - \mu_\sigma \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu_x \Psi}{y} dx \end{cases} \quad (2.2.11)$$

Пользуясь теоремой Тихонова (Романовский и др., 1975), мы находим, что переменная Ψ является “медленной”, а σ “быстрой”. Следовательно, переменную концентрации субстрата в среде σ можно заменить её стационарным значением, и тогда система (2.2.11) редуцируется до одного уравнения для Ψ :

$$\frac{\partial \Psi}{\partial t} - \tau x \mu_x \frac{\partial \Psi}{\partial x} = \tau \Psi \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_x), \quad (2.2.12)$$

где, не исключая общности, мы положили $\mu_\sigma = 1$. Решение уравнения (2.2.12) мы проведем для двух типов зависимости $\mu_x(x)$ - нулевого ($\mu_x \sim x^0$) и линейного ($\mu_x \sim x^1$) приближений.

1. Нулевое приближение. Пусть $\mu_x = 1$ и начальное распределение плазмид по клеткам задано в виде волнового пакета с малой дисперсией a^2 :

$$\Psi(x,0) = \theta(1-x) e^{-\frac{(x-1)^2}{a^2}} \quad (2.2.13)$$

где $\theta(x)$ - функция Хевисайда:

$$\theta(x) = \begin{cases} 0, & x < 0 \\ 1, & x \geq 0 \end{cases}.$$

Характеристическая система уравнения (2.2.12) записывается как:

$$dt = \frac{dx}{-\tau x \mu_x} = \frac{d\Psi}{\Psi \left\{ \tau \mu_x + \tau x (\mu_x)' \right\}}, \quad (2.2.14)$$

и при $\mu_x = 1$ первые интегралы системы находятся интегрированием выражения (2.2.14):

$$\begin{aligned} x \cdot \exp(\tau t) &= C_1, \\ \Psi(x, t) \cdot \exp\{-\tau t\} &= C_2. \end{aligned} \quad (2.2.15)$$

Тогда общее решение уравнения (2.2.14) имеет вид $H(C_1, C_2) = 0$, где H - любая аналитическая функция от двух аргументов. При $t = 0$ в случае начального распределения (2.2.3) функция H принимает вид:

$$H(C_1, C_2) = \theta(1 - C_1)e^{-\frac{(C_1-1)^2}{a^2}} - C_2, \quad (2.2.16)$$

Подставляя первые интегралы C_1, C_2 в уравнение $H(C_1, C_2) = 0$, мы получаем частное решение системы (2.2.14), удовлетворяющее начальному распределению (2.2.13):

$$\Psi(x, t) = \theta(1 - xe^{\tau t}) \cdot \exp\left\{\tau t - \frac{(xe^{\tau t} - 1)^2}{a^2}\right\}. \quad (2.2.17)$$

Выражение (2.2.17) описывает снижение концентрации плазмиднесущих клеток с течением времени³ (рис. 2.2.2). Дисперсия распределения при такой динамике, как это видно из рисунка 2.2.2, уменьшается. Как это не странно, но скорость элиминации плазмиднесущих клеток совпадает со скоростью снижения средней копияности в популяции микроорганизмов, которое дается отношением $\int_0^1 x\Psi(x, t)dx / \int_0^1 \Psi(x, t)dx$. Для ситуации, когда скорость роста плазмидсодержащих клеток не зависит от числа копий плазмиды на клетку (решение дано выражением (2.2.17)), снижение среднего числа копий пропорционально $\exp(-\tau Dt)$, что, впрочем, объясняется зависимостью вероятности потери одной копии плазмиды от их количества.

Анализ экспериментальных данных *Jones et al.* (Jones et al., 1980) и *Brownlie et al.* (Brownlie et al., 1990), изображенных на рис. 2.2.3 демонстрирует корректность этих рассуждений. В этих экспериментах авторы прослеживали динамику плазмиднесущих бактерий при различных условиях культивирования. При тщательном анализе этих данных

³ Необходимо напомнить, что это приближение работает, пока копияность не упала до предельно малых значений (например, 20% от исходной концентрации).

мы обнаружили, что хотя авторы и использовали различные условия культивирования и разные плазмиды, динамика среднего числа копий на клетку в популяции бактерий являлась близкой к экспоненциальной (регрессионный коэффициент $r > 0.9$), как это и предсказывается решением (2.2.17) (за исключением начальных точек, где мы полагаем возможный лаг период при инокуляции новой культуры (Davis et al., 1990; Monod, 1949)).

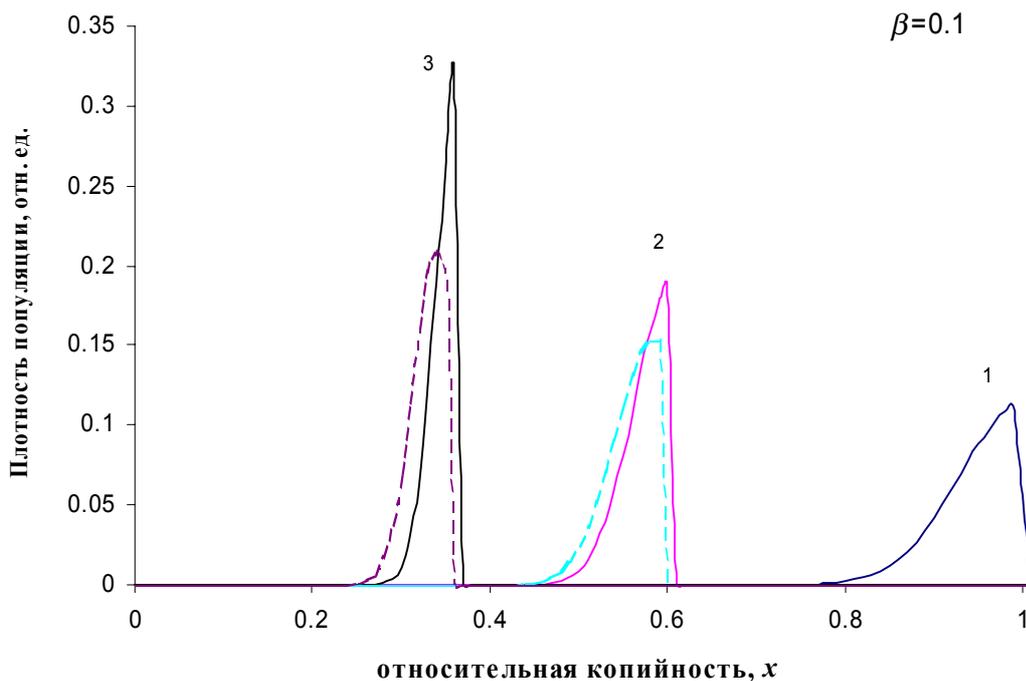


Рис. 2.2.2. Динамика распределения клеток по количеству копий плазмиды на клетку в хемостате в приближении стационарного роста. Непрерывная линия $\mu_x = 1$ (расчет по формуле (2.2.17)), штрихованная — $\mu_x = 1 - \beta x$ (формула 2.2.26). Параметры модели: $v = \mu_{\sigma} = 1$, $\tau = 0.01$, $a = 0.1$, $\beta = 0.1$. 1- начальное распределение, 2- распределение после 50 t (безразмерного времени см. (2.2.9)), 3- распределение после 100 t .

Обе плазмиды pBR322 и pAT153 являлись сегрегационно нестабильными при непрерывном культивировании в хемостате, более того, соответствующие скорости потери плазмид (что отражено в общей модели (2.2.4) и в частном решении (2.2.17) параметром τ) были оценены как $\tau \approx 0.03$ и $\tau \approx 0.09$ на генерацию соответственно для pBR322 и pAT153. Очевидно, что разные плазмиды (pBR322 и pAT153) снижают свою копияность с разной скоростью. Существенно однако, что две оценки (0.03 и 0.09) являются гораздо меньшими, чем предсказывается простой моделью, разработанной Паулсоном с соавт. (Paulsson et al., 1998), где $\tau = \ln 2 \approx 0.69$ (см. главу 3). К сожалению, причины этого разительного несоответствия еще пока не совсем ясны, и мы в настоящее время работаем

над исследованием этого вопроса. Одной из рабочих гипотез является предположение о более сложном характере динамики средней копийности (например, при изменении среднего размера клеток при длительном культивировании (Akerlund et al., 1995; Churchward et al., 1982)), который не учитывается простой моделью (Paulsson et al., 1998). Другим интересным наблюдением является то, что решение (2.2.17) описывает динамику снижения числа копий даже при малой копийности (~10-20%), где, строго говоря, решение (2.2.17) не может быть применено.

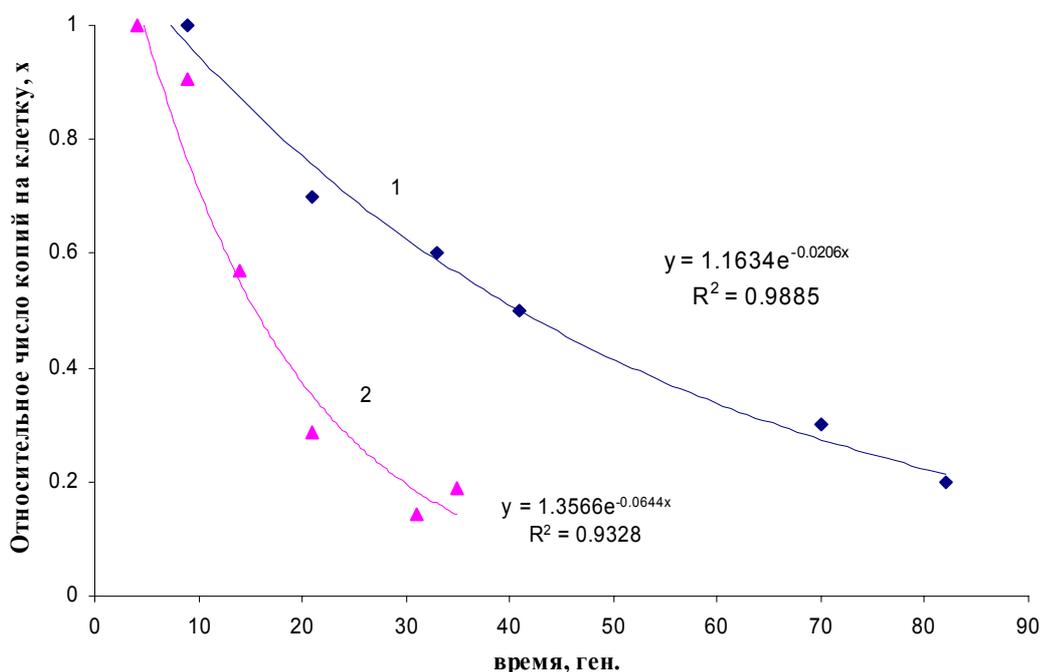


Рис. 2.2.3. Динамика среднего числа копий плазмиды pBR322 (ромб, (Jones et al., 1980)) и pAT153 (треугольник, (Brownlie et al., 1990)) при непрерывном культивировании в хемостате при скорости протока $D=0.25 \text{ час}^{-1}$ (1) и $D=0.15 \text{ час}^{-1}$ (2). Непрерывные линии получены в соответствии с предсказанием модели (2.2.17). Скорость потери плазмид была оценена как $\tau \approx 0.03$ и $\tau \approx 0.09$ на генерацию соответственно для pBR322 и pAT153.

2. Линейное приближение. Известно, что экспрессия клонированных в плазмидах генов влияет на максимальную удельную скорость роста популяции, содержащей эти гены (Aiba et al., 1982; Bailey et al., 1986; Bentley et al., 1990; Chiang and Bremer, 1988; Dunn et al., 1995; Fleming and Patching, 1994; Imanaka and Aiba, 1981; Imanaka et al., 1980; Lee and Edlin, 1985; Lin-Chao and Bremer, 1986; Nguyen et al., 1989; Summers, 1996; Uhlin and Nordstrom, 1977; Walmsley et al., 1983; Zund and Lebek, 1980). Хотя и точный механизм этого явления пока не выяснен до конца, и вероятно является уникальным для каждой плазмиды, в математической модели (2.2.11) эту феноменологическую зависимость можно

выразить следующим образом:

$$\mu = \mu(x, S, \varepsilon) = \frac{\mu_{\max}(\varepsilon) \cdot S}{K_s + S}, \quad (2.2.18)$$

где ε - эффективность экспрессии плазмидных генов. При условии, что затраты на экспрессию плазмидных генов много меньше затрат на рост и поддержание жизнедеятельности бактерий, или $\varepsilon_{\max} / \mu_{\max} \ll 1$, мы получаем:

$$\mu_{\max}(\varepsilon) = \mu_{\max}(0) - \left. \frac{d\mu_{\max}}{d\varepsilon} \right|_{\varepsilon=0} \cdot \varepsilon + o(\varepsilon). \quad (2.2.19)$$

Из предположения о независимой экспрессии различных копий в клетке бактерии следует:

$$\varepsilon = \varepsilon(x) = \varepsilon_{\max} \cdot x. \quad (2.2.20)$$

Нормируя удельную скорость роста на μ_{\max} , окончательно находим связь скорости роста популяции плазмиднесущих микроорганизмов и средней копийности:

$$\frac{\mu(x, S, \varepsilon)}{\mu_{\max}} \approx \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{\varepsilon_{\max}}{\mu_{\max}} x \right] = \mu_{\sigma} \cdot [1 - \beta x], \quad (2.2.21)$$

где параметр β характеризует влияние эффективности экспрессии клонированных в плазидах генов на удельную скорость роста популяции рекомбинантного штамма ($\beta x = \alpha$, где α - селективный коэффициент, см. выражение (1.2.2)) и ε_{\max} - эффективность экспрессии плазмидных генов при максимальной копийности $x=1$ (Ганусов и др., 2000). Рассмотрим два случая: точное решение при $\mu(x) = (1 - \beta x)$ и решение при $\mu(x) = (1 - \beta x)/(1 - \beta)$.

Решение 1. Приближение $\beta \ll 1$ обычно справедливо при слабой зависимости удельной скорости популяции от количества копий плазмиды в клетках, что часто наблюдается для векторных плазмид в неселективных условиях (Chiang and Bremer, 1988;

Engberg et al., 1975; Smith and Bidochka, 1998; Zund and Lebek, 1980).

Характеристическая система уравнения (2.2.12) в случае $\mu(x) = (1 - \beta x)$ имеет вид :

$$dt = \frac{dx}{-\tau x(1 - \beta x)} = \frac{d\Psi}{\Psi\{\tau(1 - \beta x) - \beta x - \tau x \beta\}} \quad (2.2.22)$$

Тогда решение первого уравнения системы (2.2.22) есть:

$$\begin{aligned} -\tau t + C_1 &= \int \frac{dx}{x(1 - \beta x)} = \ln(x) + \beta \ln(1 - \beta x) \\ C_1 &= x \cdot (1 - \beta x)^\beta \cdot e^{\tau t} \end{aligned} \quad (2.2.23)$$

Интегрируя (2.2.23), мы находим первые интегралы:

$$\begin{aligned} \Psi(x, t) &= C_2 e^{\tau \left(2 + \frac{1}{\tau}\right) \ln[1 - \beta x]} \\ C_1 &= \frac{x e^{\tau t}}{1 - \beta x} \end{aligned} \quad (2.2.24)$$

Проводя аналогичные нулевому приближению вычисления и используя начальное распределение в виде (2.2.13), мы получаем следующее выражение для динамики распределения клеток по количеству копий плазмиды в хемостате:

$$\Psi(x, t) = \theta [1 - x e^{\tau t}] \cdot \exp \left\{ \tau t - \frac{[1 - x e^{\tau t}]^2}{a} - \ln \left[1 + \beta x \left(\frac{1}{\tau} + 2 \right) (e^{\tau t} - 1) \right] \right\}. \quad (2.2.25)$$

Решение 2. Решение (2.2.25) предполагает, что динамическая замена клеток с высокой копийностью ($x \approx 1$) на штамм с малой копийностью ($x < 1$) качественно не меняет стационарное состояние в непрерывной культуре. Хотя это приближение может быть верным при очень малых β , мы получим другое решение, когда $\mu(x) = (1 - \beta x)/(1 - \beta)$. При таком выборе скорости роста, селективное преимущество бесплазмидных клеток α выражается таким же образом, как и в предыдущем случае, т.е. $\alpha(x) = \beta x$. Используя начальное распределение в виде (2.2.13), мы находим следующее выражение для дина-

мики распределения клеток по количеству копий плазмиды в хемостате в случае точного решения:

$$\Psi(x, t) = \Psi_0 \left[\frac{x \exp\left(\frac{\tau t}{1-\beta}\right)}{1 + \beta x \left(\exp\left(\frac{\tau t}{1-\beta}\right) - 1\right)} \right] \exp \left\{ \frac{\tau + \beta}{1-\beta} t - \left(\frac{1}{\tau} + 2\right) \text{Ln} \left[1 + \beta x \left(\exp\left(\frac{\tau t}{1-\beta}\right) - 1\right) \right] \right\} \quad (2.2.26)$$

Заметим, что переходя к пределу $\beta \rightarrow 0$, мы получаем, что выражение (2.2.26) (как и (2.2.25)) переходит в (2.2.17). Динамика этого распределения изображена на рис. 2.2.2, из которого видно, что даже настолько упрощенная модель предсказывает большую скорость элиминации плазмид при их высокой “стоимости” (большие β), что впрочем достаточно тривиально. Отметим, что плотность популяции рекомбинантного штамма также меньше для плазмид с высокой β , что связано с энергетическими затратами клетки на репликацию и поддержание плазмид.

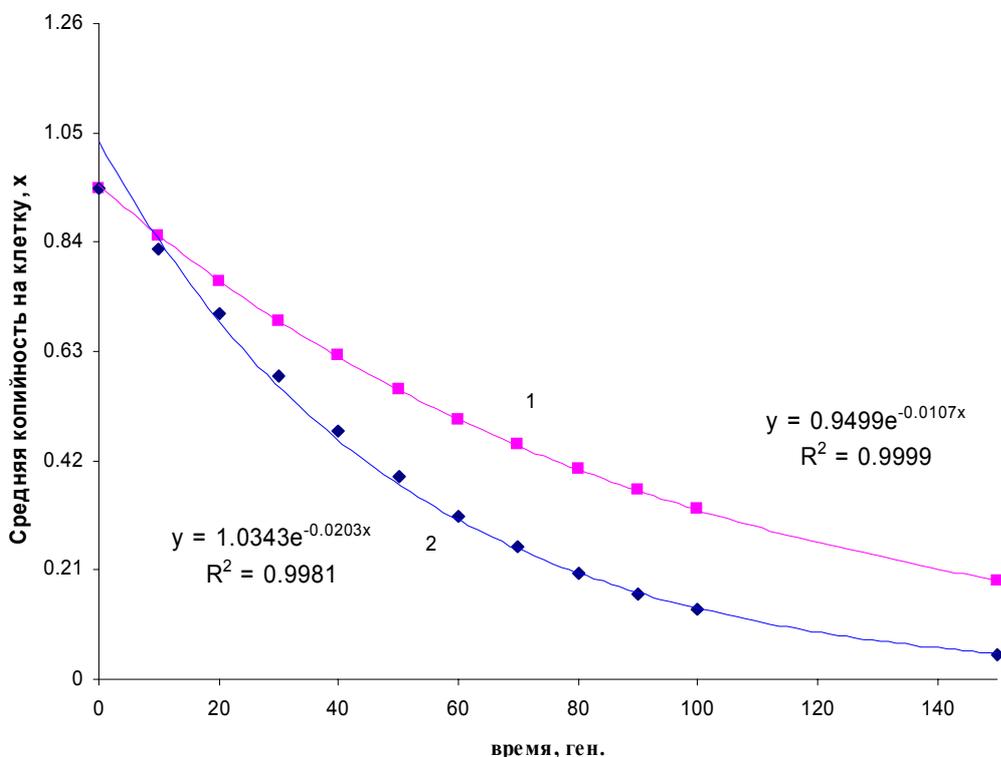


Рис. 2.2.4. Изменение средней копииности в популяции плазмидсодержащих клеток при культивировании в хемостате при $\tau = 10^{-2}$, 1- $\beta = 0.1$, 2- $\beta = 0.5$. Точки рассчитаны в соответствии с выражением (2.2.26), непрерывные линии описывают экспоненциальную регрессию.

Решение (2.2.27) также подразумевает, что в появление малокопийных вариантов в изначально гомогенной плазмидсодержащей популяции вовлечены два основных процесса. Во-первых, плазмиды теряются при их неравной сегрегации (или, если это более удобно, через “разбавление” плазмид), что описывается параметром τ и дано решением (2.2.17). При малых β мы ожидаем скорость снижения средней копияности порядка τ , что и продемонстрировано на рис. 2.2.4 (регрессия кривой 1). Увеличение β ведет к непропорциональному увеличению скорости снижения средней копияности плазмиды в популяции микроорганизмов (на рис. 2.2.4 - в два раза, регрессия кривой 2). Таким образом, модель предсказывает, что повышение энергетической стоимости плазмиды, характеризуемой параметром β (или $\alpha = \beta x$ при $x = \text{const}$), ведет к снижению общей стабильности плазмиднесущих клеток микроорганизмов при непрерывном культивировании.

Время полуэлиминации плазмид в хемостате. Используя математическую модель (2.2.10) мы можем определить характерное время, в течение которого полное число плазмид в популяции плазмидсодержащего штамма снизится вдвое (или так называемое, время полуэлиминации плазмид (Ганусов и др., 1999; Ганусов и Брильков, 1999; Ганусов и др., 2001)). Это время удовлетворяет следующему неравенству:

$$\frac{g}{\tau + \alpha_{\max}} \leq T_{1/2} \leq \frac{g}{\tau}, \quad (2.2.27)$$

где $g = \ln(2)/D$ - время генерации в хемостате со скоростью протока D и α_{\max} - максимальное значение селективного коэффициента, который определен как $\alpha(x) = 1 - \mu(x, S)/\mu(0, S)$. Докажем это утверждение. Для этого обозначим полное количество плазмид в популяции как:

$$L(t) = \int_0^1 x \Psi(x, t) dx. \quad (2.2.28)$$

Из системы (2.2.10) и определения (2.2.28) мы получаем, что $L(t)$ удовлетворяет следующей системе дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial \Psi}{\partial t} = [\mu(x, \sigma) - v] \Psi + \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu(x, \sigma) \cdot \Psi), \\ \frac{dL}{dt} = -v \cdot L + (1 - \tau) \cdot \int_0^1 x \mu(x, \sigma) \Psi dx, \\ \frac{d\sigma}{dt} = v(\sigma_0 - \sigma) - \int_0^1 \frac{\mu(x, \sigma) \Psi}{y} dx. \end{cases} \quad (2.2.29)$$

$$1. T_{1/2} \leq \frac{g}{\tau}.$$

Для доказательства этого неравенства мы предположим, что скорость роста плазмидсодержащих клеток не зависит от копийности этих клеток, т.е. $\alpha = 0$. Стационарное состояние в хемостате в этом приближении будет достигнуто с экспоненциальной скоростью e^{-Dt} за несколько генераций. По определению в стационарном состоянии в хемостате должны выполняться следующие условия (Herbert et al., 1965; Moser, 1958):

$$\begin{aligned} \mu(x, \bar{\sigma}) &\approx v, \\ d\bar{\sigma} / dt &= 0. \end{aligned} \quad (2.2.30)$$

С учетом (2.2.30) и модели (2.2.29) мы с легкостью находим, что $T_{1/2} = \frac{g}{\tau}$, которое при $\alpha \neq 0$ очевидно является верхней оценкой.

$$2. T_{1/2} \geq \frac{g}{\tau + \alpha_{\max}}.$$

Для $\alpha \neq 0$ с учетом определения селективного преимущества как $\alpha(x) = 1 - \mu(x, S) / \mu(0, S)$, мы находим следующее уравнение для динамики полного числа копий:

$$\frac{dL}{dt} = -vL + (1 - \tau) \mu(0, \sigma) \int_0^1 x \Psi(x, t) (1 - \alpha(x)) dx \quad (2.2.31)$$

В процессе элиминации плазмидсодержащего штамма микроорганизмов следующее неравенство верно: $\mu(0, \sigma) \geq v$. Соответственно, с учетом этого условия производная от полного числа копий $\dot{L}(t)$ в уравнении (2.2.31) является ограниченной:

$$\frac{dL}{dt} \leq -\tau v L - v \int_0^1 \alpha(x) x \Psi(x, t) dx \leq \tau v L - v \alpha_{\max} L \quad (2.2.32)$$

что доказывает вторую часть неравенства (2.2.27).

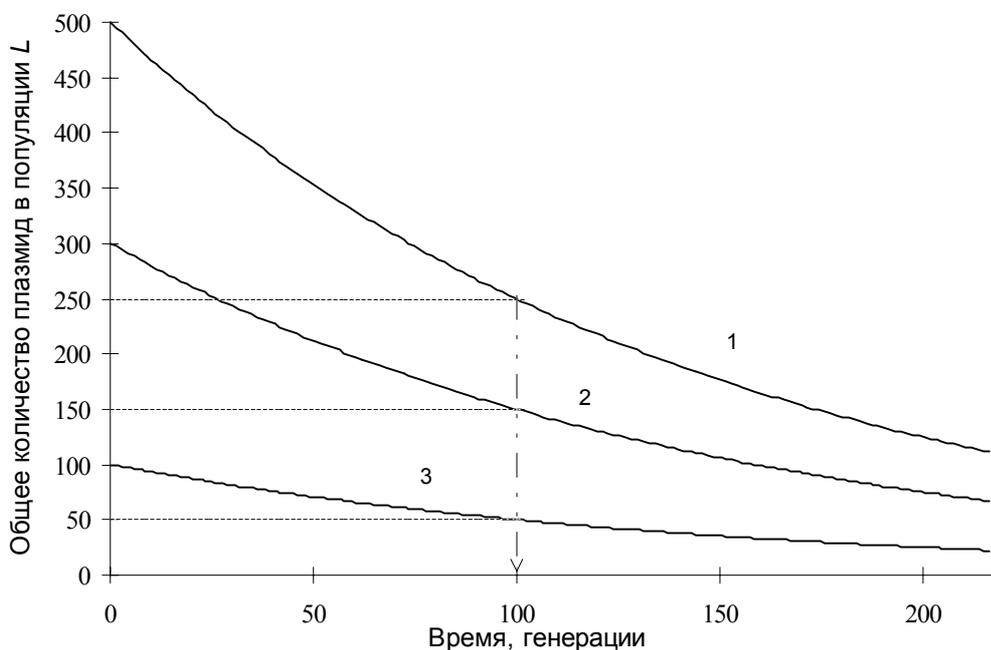


Рис. 2.2.5. Снижение полного числа копий плазмиды в популяции в хемостате в не-селективных условиях при разном максимальном числе копий в клетке N ($\tau = 10^{-2}$). 1 - $N = 50$, 2 - $N = 30$, 3 - $N = 10$. Стрелкой отмечено время полуэлиминации плазмид. По оси ординат - общее количество плазмид в популяции бактерий в условных единицах.

Из неравенства (2.2.27) следует, что время полуэлиминации плазмид из популяции в стационарном состоянии в хемостате определяется тремя основными параметрами плазмидосодержащего штамма: временем генерации (которое в общем случае задается скоростью протока), скоростью потери плазмид при делении, характеризуемой параметром τ , и селективным преимуществом бесплазмидных клеток (точнее, его максимальным значением). Тот факт, что при $\alpha = 0$ время полуэлиминации не зависит от *максимального числа* копий плазмиды в клетке, продемонстрирован на рис. 2.2.5.

Таким образом, если известны параметр τ , среднее время генерации клеток микроорганизмов g и максимальное значение селективного коэффициента α_{\max} , то с помощью выражения (2.2.27) можно оценить характерную длительность процессов ферментации штаммов сверх-продуцентов до того момента времени, когда продуктивность рекомбинантного штамма снизится из-за потери плазмид с клонированными в них генами примерно вдвое. С этой точки зрения, время полуэлиминации (2.2.27) может служить важной характеристикой популяционной устойчивости генноинженерных штаммов-продуцентов.

Ограничения. Частные решения математической модели (2.2.10), как мы упомянули ранее, были получены с использованием двух серьезных ограничений. Во-первых, мы предположили, что в начале культивирования (или, что тоже самое, в инокулянтной культуре) все клетки содержат достаточно большое число копий плазмиды. Если это приближение не выполняется (что возможно в определенных ситуациях), непрерывная модель перестает работать, так как в этом случае изменение относительной копийности на одну копию $1/N$ не является малым (что было использовано при выводе непрерывной модели), и, следовательно, не непрерывная, а дискретная модель должна быть использована для описания динамики распределения клеток с разной копийностью и изменение среднего числа копий на клетку (см. главу 3). Более того, низкая начальная средняя копийность в популяции плазмидсодержащих микроорганизмов может привести к образованию существенной фракции бесплазмидных клеток, которые могут кардинально изменить последующую динамику плазмиднесущего штамма (см, например, (Jones et al., 1980)), и динамика которых не учитывается явным образом в приближенной модели (2.2.10). Во-вторых, для понимания эссенции динамики распределения клеток с различным числом копии плазмиды мы также пренебрегли контролем копийности плазмиды, описываемый функцией $\lambda(x)$. Это приближение может быть обосновано, если мы предположим, что стационарное значение средней копийности плазмидсодержащего штамма при длительном культивировании является достаточно низкой. Приближенное уравнение на стационарное значение средней копийности в этом случае выражается как $\lambda(x) = \tau\mu x$, и следовательно, если $x \ll 1$, то $\lambda(x) \ll 1 \approx 0$, что и было использовано в модели (2.2.10).

Простейший анализ показывает, что могло бы произойти с динамикой среднего числа копий и распределения клеток с разной копийностью, если бы два вышеупомянутых условия не были бы удовлетворены в конкретной ситуации. Если $\tau_0(x) \neq 0$, динамика не меняется существенно при малых β , хотя при $\beta \approx 1$ динамика может отличаться от предсказываемой решениями (2.2.25) и (2.2.26) и изображенной на рис. 2.2.2 и 2.2.4. С другой стороны, учет контроля копийности ($\lambda(x) \neq 0$) приведет к снижению скорости уменьшения среднего числа копий на клетку из-за репликации плазмид, и, следовательно, при $x \approx 0$ мы ожидаем отклонение снижения средней копийности от экспоненциального закона, что частично подтверждено на рис. 2.2.3 (кривая 2), где после 30 генераций роста плазмидсодержащего штамма в непрерывной культуре изначально уменьшающаяся средняя копийность плазмид рАТ153 начала увеличиваться в последующих 5 генерациях, что

вполне может соответствовать “включению” негативного контроля копийности.

В заключении этой главы, мы рассмотрим анализ стационарных распределений непрерывной модели в селективных и неселективных для поддержания плазмид условиях, где мы опять используем следующие приближения: $\lambda(x) \approx 0$ и $\tau_0(x) \approx 0$. Последствия нарушения этих условий мы обсудим в конце этой части.

Стационарные решения. Стационарные распределения можно получить из математической модели (2.2.10) при $t \rightarrow \infty$, когда производные по времени равны нулю. В этом случае система (2.2.10) упрощается:

$$\begin{cases} [\mu_\sigma \mu_x - v] \bar{\Psi} + \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_\sigma \mu_x \cdot \bar{\Psi}) = 0, \\ v(\sigma_0 - \bar{\sigma}) - \mu_\sigma \int_0^\infty \frac{\mu_x \bar{\Psi}}{y} dx = 0. \end{cases} \quad (2.2.33)$$

Проанализируем решения стационарной математической модели (2.2.33) в селективных и неселективных для поддержания плазмид условиях.

Неселективные условия. В неселективных условиях удельная скорость роста популяции обычно не зависит от количества копий плазмиды в клетке, т.е. $\mu_x = 1$, либо зависит “слабо”, т.е. $\mu_x = 1 - \beta x$. В этом случае ($\mu_x = 1$) стационарное распределение бактериальных клеток по количеству копий в клетке имеет вид:

$$\bar{\Psi}(x) = Cx^{\left\{ \frac{1}{\tau} \left(\frac{\mu_\sigma - 1}{v} \right) - 1 \right\}}, \quad (2.2.34)$$

где C - нормировочная константа, которая находится из условия стационарности для второго уравнения системы (2.2.33):

$$\int_0^\infty \bar{\Psi}(x) dx = \bar{\Psi}_\Sigma [\bar{\sigma}] = \sigma_0 - \bar{\sigma}, \quad (2.2.35)$$

где Ψ_Σ - стационарное значение полной биомассы клеток. В стационарном состоянии в хемостате выполняется условие $\mu(x, \sigma) \approx v$, тогда, очевидно, $\bar{\Psi}(x) = C/x$. Используя

(2.2.34), с учетом (2.2.35) мы легко получаем явный вид стационарного распределения в неселективных для поддержания плазмид условиях:

$$\bar{\Psi}(x, t) = \lim_{A \rightarrow 0} \left[-\frac{\bar{\Psi}_{\Sigma}}{2x \cdot \ln(A)} \right] = \bar{\Psi}_{\Sigma} \delta(x), \quad (2.2.35)$$

где $\delta(x)$ - дельта- функция Дирака. Из выражения (2.2.35) следует, что непрерывного стационарного распределения в неселективных условиях не существует, т.е. в этом случае при $t \rightarrow \infty$ в хемостате существуют только бесплазмидные клетки.

Селективные условия. В селективных для поддержания плазмид условиях, например, при ингибировании роста бактерий антибиотиками, устойчивость к которым у бактерий детерминируется плазмидными генами, можно предположить, что удельная скорость роста популяции прямо пропорциональна количеству копий плазмиды в клетках этой популяции (для более общего случая см. выражение (2.1.7)). В этом случае можно положить, что $\mu_x = Kx$, где K - коэффициент пропорциональности, связанный определенным образом с константой ингибирования. Конечное стационарное распределение клеток в популяции бактерий по копиям плазмиды при культивировании в хемостате выражается тогда следующим образом:

$$\bar{\Psi}(x) = C \frac{\exp\left[-\frac{v}{\tau\mu_{\sigma}Kx}\right]}{x^{2+\frac{1}{\tau}}}. \quad (2.2.36)$$

Окончательное, нормированное с учетом условия (2.2.35) распределение тогда принимает форму:

$$\bar{\Psi}(x) = \frac{\bar{\Psi}_{\Sigma}}{\Gamma\left(1+\frac{1}{\tau}\right) \cdot \left(\frac{\tau\mu_{\sigma}K}{v}\right)^{1+\frac{1}{\tau}}} \cdot \frac{\exp\left[-\frac{v}{\tau\mu_{\sigma}Kx}\right]}{x^{2+\frac{1}{\tau}}}, \quad (2.2.37)$$

где $\Gamma(1 + 1/\tau)$ - гамма-функция Эйлера.

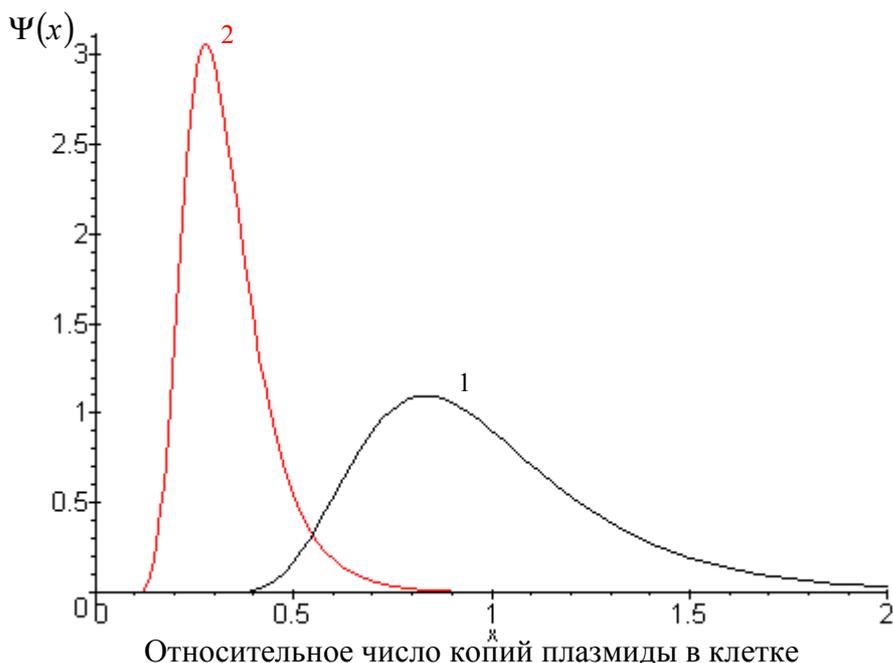


Рис. 2.2.6. Стационарное распределение клеток по копиям плазмиды в хемостате в селективных для поддержания плазмид условиях в соответствии с формулой (2.2.36), $\tau = 0.1$. 1 - $K = 1$; 2 - $K = 3$.

Стационарное распределение (2.2.37) представляет собой несимметричную кривую, и для разных значений параметра K изображено на рис. 2.2.6 (ср. с (Bailey et al., 1983; Lobner-Olesen, 1999; Srienc et al., 1986; Tseng et al., 1997)). Очевидно, что существует критическое значение копийности, не обеспечивающее выживания малокопийных клеток в селективных условиях. Выражение (2.2.37) включает в себя и возможность многократного увеличения среднего числа копий плазмиды в клетке в селективных условиях (амплификации) при соответствующих значениях постоянной K , величина которой характеризует уровень селективного давления.

Ограничения. Как и в предыдущем случае, снятие ограничений $\lambda(x) \approx 0$ и $\tau_0(x) \approx 0$ приводит к в какой-то мере другим результатам. В неселективных условиях, однако, плазмиды действительно не могут поддерживаться бесконечно долго, и в конце концов начальный плазмидсодержащий штамм заменяется бесплазмидным вариантом, но по причине ненулевой вероятности образования бесплазмидной клетки τ_0 (т.е. если $\tau_0(x) \neq 0$). В селективных же условиях образование бесплазмидных клеток не является важным из-за отсутствия роста таких клеток в присутствии, например, антибиотика (мы исключаем возможность разрушения внеклеточного антибиотика плазмидсодержащими клетками, а сле-

довательно возможность роста бесплазмидных вариантов). С другой стороны, наличие негативного контроля копийности $\lambda(x) \neq 0$ приведет к селекции клеток с копийностью \tilde{x} , определяемой в уравнении $\lambda(\tilde{x}) = \tau\mu(\tilde{x}, S)\tilde{x}$ (см. главу 3), соответственно, стационарное распределение будет представлять дельта-функцию $\delta(\tilde{x})$ в отличие от предсказываемого (2.2.37). Стационарное распределение (2.2.37) может наблюдаться для плазмид с нарушенным механизмом контроля копийности (Chiang and Bremer, 1991), когда определенная копийность плазмиды селекционируется скорее уровнем антибиотика, а не негативным контролем репликации плазмид.

Эта часть завершает анализ непрерывной модели, которая при всей своей ограниченности, тем не менее способна описать многие наблюдаемые экспериментальные данные (снижение среднего числа копий в популяции рекомбинантного штамма, динамику распределения клеток с различной копийностью, время полуэлиминации плазмид из хемотрата и некоторые другие). Следующая глава посвящена анализу дискретной математической модели (которая также является приближенной), где мы рассмотрим популяционную динамику плазмидсодержащих микроорганизмов при различных условиях управляемого культивирования, сравним ее с предсказанием точной модели и проанализируем на ее основе некоторые экспериментальные данные.

ГЛАВА 3.

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТА МНОГОКОПИЙНОСТИ ПЛАЗМИДЫ НА ПОПУЛЯЦИОННУЮ ДИНАМИКУ ПЛАЗМИДСОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИЙ

3.1. Анализ дискретной модели: связь с точной моделью и динамикой средних.

Предложенная и исследованная в предыдущей главе непрерывная модель популяционной динамики микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды, кроме ряда обсужденных недостатков обладает также одним серьезным ограничением: она описывает динамику плазмид, предполагая их непрерывное изменение от варианта с числом копий x к варианту с копийностью $x + dx$. Это свойство вполне может выполняться для высококопийных плазмид (плазмид, у которых средняя копийность достигает 50-100 копий на клетку), однако очевидно является неприменимым для плазмид с промежуточной или малой средней копийностью (порядка 5-30 копий на клетку). Для описания популяционной динамики мало- и среднекопийных штаммов микроорганизмов мы предлагаем основанную на подходе (2.2.4) дискретную модель, где переменной является фактическое число копий плазмиды на клетку i , и которая описывает изменение распределения клеток с различным числом копий в популяции микроорганизмов. Несмотря на то, что модель (2.2.5) была получена из “первых принципов” (уравнение непрерывности), в этой части мы предлагаем альтернативный подход.

Рассмотрим изменение численности под-популяции, в которой каждая клетка содержит точно i копий плазмиды. Обозначим значение плотности этой суб-популяции в момент времени t как $X_i(t)$. В следующий бесконечно близкий момент времени $t + dt$ три основных события может произойти с клетками этой под-популяции (см. рис. 3.1.1). Во-первых, благодаря негативному контролю копийности, число копий в клетке может возрасти до $i+1$, что определяется скоростью репликации плазмид λ_i , очевидно зависящей от числа копий плазмиды в под-популяции. Если копийность i является достаточно большой, то $\lambda_i \approx 0$, и соответственно, вероятность увеличения числа копий бесконечно мала (см. также рис. 2.1.2). Во-вторых, так как все клетки имеют определенную вероятность деления, определяемую скоростью роста μ_i (которая равна $1 - \exp(-\mu_i t)$), клетки могут поделиться в момент времени $t + dt$ и, таким образом, при случайной сегрегации плазмид по дочерним клеткам могут привести к образованию бесплазмидной клетки с вероятностью

$\tau_0(i)$. Более того, случайное распределение плазмид также приводит к снижению (в среднем) копияности от i до $i-1$ со скоростью $\tau_i \mu_i X_i$ (рис. 3.1.1)

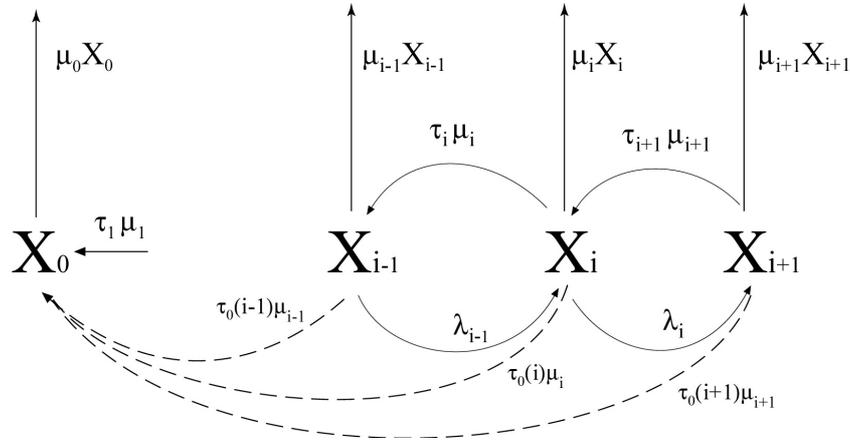


Рис. 3.1.1. Простейшая репрезентация процессов, вовлеченных в популяционную динамику клеток с различной копияностью. λ_i - скорость репликации плазмид (из-за негативного контроля копияности), τ_i - параметр, характеризующий скорость “разбавления” плазмид при делении (с учетом *случайного* распределения плазмид между дочерними клетками), $\tau_0(i)$ - вероятность образования бесплазмидной клетки при делении клетки с i копиями плазмиды.

Необходимо подчеркнуть, что описанный процесс (рис. 3.1.1) является приближенным, т.к. мы не описываем подробно как происходит сегрегация (и вообще-то репликация) плазмид, а заменяем этот процесс на приближенный - снижение (в среднем) копияности при случайном распределении, что впрочем может быть проинтерпретировано как “разбавление” плазмид пропорционально их количеству. Этим свойством также обладает и динамика средних (см. далее).

Суммируя все вышесказанное, дискретная математическая модель, описывающая динамику плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов принимает вид:

$$\begin{cases} \frac{dX_0}{dt} = (\mu_0(S) - D)X_0 + \tau\mu_1(S)X_1 + \sum_{i=1}^N \tau_0(i)\mu_i(S)X_i, \\ \dots\dots\dots \\ \frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S) - D)X_i - \tau i \mu_i(S)X_i + \tau(i+1)\mu_{i+1}(S)X_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \sum_{i=0}^N \frac{\mu_i(S)X_i}{Y_i}, \end{cases} \quad (3.1.1)$$

Анализ этой математической модели мы проведем в несколько этапов. Во-первых, мы

рассмотрим как модель (3.1.1) отражает зависимость среднего числа копий плазмиды от условий культивирования, а также попробуем понять, каким образом динамика изменения среднего числа копий плазмиды в популяции микроорганизмов происходит. На основе динамики средних и некоторых экспериментальных наблюдений мы проанализируем популяционную динамику плазмидсодержащих бактерий в хемостате, основываясь на данных Джонса с соавт. (Jones et al., 1980). Во-вторых, мы кратко остановимся на сравнении ранее разработанной точной модели (2.1.3), предложенной сегрегированной модели (Paulsson and Ehrenberg, 1998) и приближенной модели, примененной в этой главе с целью понять их разницу и сходность. Во второй части этой главы, мы предложим простой метод вычисления стационарных распределений клеток по числу копий плазмид в приближенной модели, и рассмотрим, как эти распределения зависят от механизма контроля копийности плазмид. Мы также предложим метод оценки параметров математической модели, основанный на знании стационарного распределения клеток с различной копийностью в популяции микроорганизмов. Наконец, мы проанализируем причины сегрегационной нестабильности рекомбинантных плазмид, а также покажем, как вариация клеточного цикла клеток микроорганизмов может повлиять на стабильность поддержания плазмид в популяции рекомбинантного штамма.

Динамика средней копийности. Для нахождения динамики среднего числа копий плазмиды в популяции мы проведем несколько последовательных упрощений, т.к. математическая модель в виде (3.1.1) представляется достаточно сложной. Во-первых, для простоты анализа, положим $\mu = const$ (отклонения от этого приближения мы обсудим позже). Также мы предположим, что динамика субстрата является быстрой, по сравнению с динамикой клеток с различной копийностью (это достаточно легко показывается в приближении малых τ и λ). Тогда $\mu = D$. Система (3.1.1) переписывается:

$$\frac{dX_i}{dt} = -\tau iDX_i + \tau(i+1)DX_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \quad (3.1.2)$$

где мы не описываем динамику бесплазмидных клеток, так как они не дают никакого вклада в среднюю копийность (как минимум в селективных условиях). Среднюю копийность (а точнее, относительную копийность) мы определим как $x = \sum_{i=1}^{\infty} iX_i / X = \sum_{i=1}^{\infty} ip_i$,

где $X = \sum_i X_i$. Для нахождения уравнения для относительной средней копийности, рассмотрим две суммы:

$$\sum_{i=1} \lambda_{i-1} i p_{i-1} = \sum_{k=0} \lambda_k (k+1) p_k = \sum_{k=0} \lambda_k k p_k + \sum_{k=0} \lambda_k p_k = \sum_{i=0} \lambda_i i p_i + \sum_{i=0} \lambda_i p_i, \quad (3.1.3)$$

$$\sum_{i=0} i(i+1) p_{i+1} = \sum_{k=1} k(k-1) p_k = \sum_{k=1} k^2 p_k - \sum_{k=1} k p_k = \sum_{i=0} i^2 p_i - n. \quad (3.1.4)$$

С учетом выражений (3.1.3) и (3.1.4) мы находим уравнение на среднее число копий плазмиды в популяции n :

$$\dot{x} = -\tau D x + \sum_{i=0} \lambda_i p_i. \quad (3.1.5)$$

Кроме своей простоты, уравнение (3.1.5) в ряде приближений предсказывает точно такую же динамику, что и непрерывная модель (2.2.4), что впрочем, не удивительно, когда мы говорим о средних. Например, при $\lambda = 0$ (при отсутствии контроля копийности либо при резкой смене условий), среднее число копий на клетку снижается экспоненциально, как и предсказывается решением (2.2.17) непрерывной модели. Тем не менее заметим, что в случае, когда λ_i нелинейно зависит от числа копий (например, при экспоненциальном механизме ингибирования), система (3.1.2) и следовательно уравнение (3.1.5) не имеют аналитического решения. Когда же $\lambda = const$, решение уравнения (3.1.5) находится простейшим интегрированием:

$$x(t) = \frac{\lambda}{\tau D} + \left[x(0) - \frac{\lambda}{\tau D} \right] \exp(-\tau D t), \quad (3.1.6)$$

где $x(0)$ - начальная относительная копийность (обычно 1). Решение (3.1.6) также предсказывает экспоненциальное снижение (точнее изменение) средней копийности со скоростью $\sim \tau D$ (средняя копийность в стационарном состоянии обозначается как $n = \tilde{x}$), хотя и с последующим замедлением (до скорости $\sim \lambda$) при подходе к стационарному значению $\lambda/\tau D$. Заметим, что при $\lambda = const$ средняя копийность в популяции микроор-

ганизмов обратно пропорциональна удельной скорости разбавления среды в хемостате D (или, в стационарном состоянии, скорости роста популяции). Это означает, что при культивировании при низких скоростях протока, клетки будут преимущественно обладать высоким числом копий, чем при больших скоростях роста. Это наблюдение подтверждается многочисленными экспериментальными данными (Atlung et al., 1999; Bailey et al., 1986; Bailey et al., 1983; Chiang and Bremer, 1988; Eliasson et al., 1992; Jones et al., 1980; Lee and Bailey, 1984a; Lee and Bailey, 1984b; Lee and Bailey, 2000; Lin-Chao and Bremer, 1986; Lin-Chao and Bremer, 1987; Wittrup and Bailey, 1988). Однако необходимо отметить, что эти экспериментальные данные относятся к случаю, когда копияность плазмиды измеряется по отношению к числу хромосом на клетку, а следовательно исключают влияние всех остальных факторов, которые могут привести к снижению копияности при малых скоростях роста (см. далее). В дополнение, решение (3.1.6) не учитывает вариабельность параметров модели от условий культивирования, что также может привести к другим предсказаниям (см. часть **стабильность плазмид**).

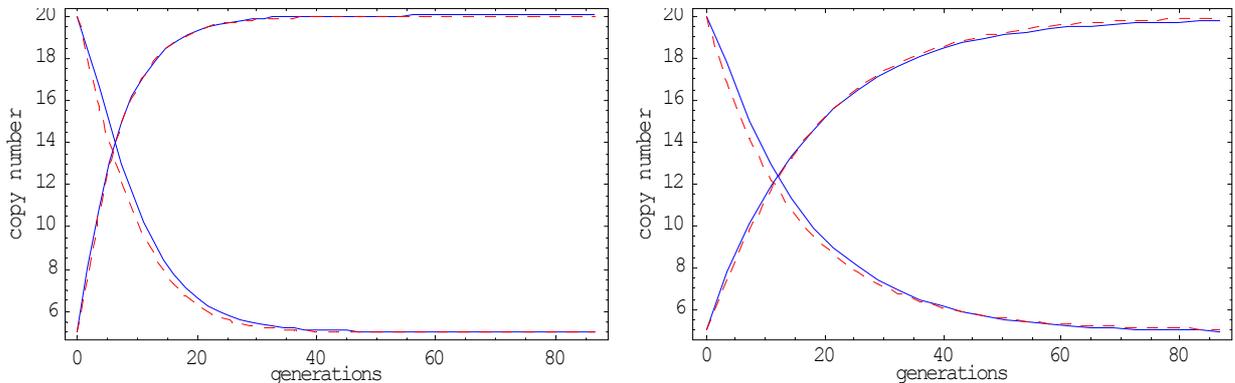


Рис. 3.1.2. Динамика средней копияности при изменении условий культивирования при экспоненциальном (левый график) и гиперболическом (правый график) механизме ингибирования. Непрерывные линии - численное решение модели (3.1.1), штрихованные - приближение (3.1.7). Параметры, использованные в расчетах: $\mu(S) = 1/(0.01 + S)$, $\theta = 10$, $\lambda = \tau\theta DK$ (гиперболический механизм ингибирования) и $\lambda = \tau D\theta \exp(-x/K)$ (экспоненциальный), $\tau = 0.1$, $D = 0.1$, $S_0 = 10$, $x(0) = 20$ (или 5), $x(\infty) = 5$ (или 20).

Уравнение (3.1.5) при $\lambda = const$, переписывается в виде $\dot{x} = \lambda - \tau Dx$, который является идентичным уравнению (2.2.3), которое описывает скорость “переноса” плазмид между клетками с близкой копияностью ($x \rightarrow x + dx$). Такое совпадение не удивительно, так как мы говорим о динамике средних, которая должна быть одинакова в непрерывной и

дискретной моделях, выведенных из одной более общей модели (подхода) (2.2.2). Основываясь на этом, мы предположили, что и в дискретной модели динамика среднего числа копий плазмиды в микробной популяции может быть описана уравнением (2.2.3), или

$$\dot{x} = \lambda(x) - \tau\mu(x, S)x. \quad (3.1.7)$$

Численные решения демонстрируют (рис. 3.1.2), что уравнение (3.1.7) достаточно хорошо описывает динамику изменения средней копийности в популяции микроорганизмов и практически точно предсказывает значение квази-стационарного числа копий плазмиды на клетку. Заметим, что как и ожидалось в полной модели (3.1.1), изменение копийности происходит наиболее быстро в случае экспоненциального ингибирования, нежели в случае гиперболического, что связано с “чувствительностью” многократного процесса “соединения-распада” молекул RNAII и RNAI (см. главу 1).

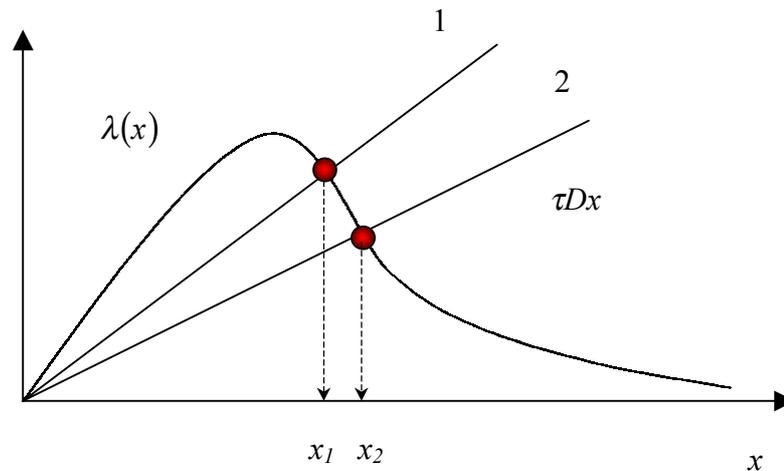


Рис. 3.1.3. Изменение стационарного значения (пересечений) средней копийности в зависимости от условий культивирования. 1 - при высоких скоростях роста D , 2- при низких D (мы предполагаем, что снижение скорости роста не влияет на функцию $\lambda(x)$, что в ряде случаев неверно (Atlung et al., 1999), и которая предполагает экспоненциальный механизм ингибирования).

Стационарная концентрация плазмид очевидно вычисляется в уравнении (3.1.7) при $\dot{x} = 0$, или, что тоже самое, в нелинейном выражении:

$$\lambda(x) = \tau\mu(x, S)x. \quad (3.1.8)$$

Решение этого уравнения может быть проведено как при помощи численных, так и с использованием графических методов. Последний подход также позволяет понять, как среднее число копий в популяции зависит от условий культивирования (удельной скорости роста популяции, селективности условий и т.п.). Один из простейших примеров изображен на рис. 3.1.3.

Здесь увеличение среднего числа копий плазмиды на клетку происходит из линейной зависимости угла наклона прямых 1 и 2, который пропорционален скорости роста популяции микроорганизмов. Соответственно, при увеличении скорости роста плазмидсодержащих клеток, средняя копияность должна упасть (при всех равных прочих условиях). Соответственно, мы делаем вывод, что уравнение (3.1.7) может быть использовано для предсказания как стационарных концентраций плазмидной ДНК в клетках микроорганизмов, так и для анализа их изменения.

Динамика средних в точной модели и ее связь с приближенной. Хотя и динамика средних, описываемая решением уравнения (3.1.7), практически не отличается от численного решения полной системы (3.1.1), математическая модель (3.1.1) все же является приближенной, и, следовательно, это не факт, что динамика (3.1.8), например, отражает снижение копияности, наблюдаемое в реальных экспериментах. Сравнение динамики среднего числа копий плазмиды на клетку в точной (2.1.3) и приближенной (3.1.1) моделях тем не менее возможно. Для этого мы используем недавно опубликованную в журнале “Плазмиды” и разработанную Паулсоном с соавт. математическую модель, которая описывает изменение средней копияности x и концентрации ингибиторной молекулы R в популяции микроорганизмов, содержащих плазмиду ColE1 (Paulsson et al., 1998).

Авторы предположили, основываясь на известном механизме контроля копияности плазмиды ColE1, что изменение концентраций плазмидной ДНК и RNAI (ингибитора) подчиняется следующей системе дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= \rho k_{II} x Q(R) - Dx, \\ \dot{R} &= (k_I - k_{II})x - (D + \varepsilon_I)R\end{aligned}\tag{3.1.9}$$

где параметры имеют следующий биологический смысл (см. (Paulsson et al., 1998), глава 1 и 2 (описание функции дорепликации плазмид $\lambda(i \rightarrow j)$): k_I - скорость образования полноценных (т.е. способных к ингибированию) RNAI молекул, k_{II} - скорость образования моле-

кулы RNA II (которая ведет к репликации плазмиды), $Q(R)$ - вероятность образования полноценного праймера RNAII для ДНК полимеразы (без связывания с комплиментарной RNAI), ρ - вероятность того, что полноценный праймер для ДНК-полимеразы приведет к репликации плазмиды, ε_I - время полураспада свободной RNA I и D - скорость роста популяции. Как было упомянуто выше (см. главу 1) и впервые пояснено в работе (Ehrenberg, 1996), вероятность транскрипции RNAII без связывания с ингибиторной молекулой RNAI (при любой конечной концентрации R это, очевидно, всегда возможно) зависит от точного механизма взаимодействия RNAI и RNAII (и последовательное образование (диссоциация) комплекса RNAII:RNAI), а точнее, от числа сайтов в “окне ингибирования”, необходимых для полного ингибирования транскрипции молекулы RNAII (Ehrenberg, 1996; Paulsson et al., 1998). Две основные зависимости были предложены (Ehrenberg, 1996):

$Q(R) = \frac{1}{1 + R/k}$, названный гиперболическим, и $Q(R) = \exp(-R/k)$, названный экспоненциальным.

Более того, разные механизмы ингибирования соответствуют различным “чувствительностям” скорости репликации плазмид $\rho k_{II} Q(R)$ к изменению концентрации R антисенсной молекулы. В случае экспоненциального ингибирования число репликаций на плазмиду в течение одного клеточного деления находится гораздо ближе к единице, чем при гиперболическом ингибировании, что, впрочем, компенсируется высокой “стоимостью” (в смысле большой скорости производства и распада молекулы RNAI) экспоненциального ингибирования (Paulsson and Ehrenberg, 1998).

Как же эта модель связана с моделью (3.1.1), предложенной в этой работе? Простейший анализ показывает, что система (3.1.9) сводится к (3.1.7) при учете высокой скорости оборота антисенсной молекулы RNAI. Ряд экспериментальных наблюдений действительно подтверждают, что в широком диапазоне условий культивирования, скорость транскрипции молекулы RNAI является очень высокой, а период полураспада RNAI составляет несколько минут (Atlung et al., 1999; Bremer and Lin-Chao, 1986; Brenner and Tomizawa, 1991; Chiang and Bremer, 1991; Lin-Chao and Bremer, 1986; Lin-Chao and Bremer, 1987; Lin-Chao and Cohen, 1991; Perelson and Brendel, 1989). Более того, как показывает анализ, проведенный в работе (Paulsson and Ehrenberg, 1998), высокая скорость оборота ингибиторной молекулы необходима для стабильной репликации плазмид. Основываясь на этих результатах, мы, следовательно, предположим, что $k_I \gg k_{II}$ и $\varepsilon_I \gg D$. Тогда второе уравнение в (3.1.9) является “быстрым” по сравнению с первым, и значение концентрации RNAI тогда

выражается:

$$R(t) \approx \frac{k_I}{\varepsilon_I} x(t). \quad (3.1.10)$$

Тогда система (3.1.9) сводится к уравнению:

$$\dot{x} = \rho k_{II} x Q\left(\frac{k_I}{\varepsilon_I} x\right) - Dx. \quad (3.1.11)$$

Сравнивая (3.1.11) с (3.1.7), мы замечаем, что они совпадают при $\tau = 1$ и параметрах $\mu(x, S) = D$ и $\lambda(x) = \rho k_{II} x Q\left(\frac{k_I}{\varepsilon_I} x\right)$. В случае гиперболического и экспоненциального механизмов ингибирования функция “перерепликации” плазмид $\lambda(x)$ принимает вид:

$$\lambda(x) = \frac{\rho k_{II} x}{1 + \frac{k_I x}{\varepsilon_I k}} = D \frac{\theta x}{1 + \frac{x}{K}} \approx D \theta K = \text{const} \quad (\text{гиперболический}) \quad (3.1.12)$$

$$\lambda(x) = \rho k_{II} x \exp\left(-\frac{k_I x}{\varepsilon_I k}\right) = D \theta x \exp\left(-\frac{x}{K}\right) \quad (\text{экспоненциальный}) \quad (3.1.12)$$

где $\theta = \rho k_{II} / D$, $K = \varepsilon_I k / k_I$ и $\tau = 1$.

Таким образом, мы нашли связь между феноменологическими параметрами популяционной динамики плазмидсодержащих микроорганизмов $\lambda(x)$ и τ и параметрами, описывающими кинетику репликации плазмид в индивидуальной клетке K и θ . Теперь, в частности, очевидно, что приближение $\lambda = \text{const}$, использованное в ряде анализированных задач, относится к ColE1- типа плазмидам с предположительно гиперболическим механизмом ингибирования репликации плазмид, тогда как функция, изображенная на рис. 3.1.3 (начальное увеличение и последовательный спад), описывает экспоненциальный механизм ингибирования.

Однако одно несоответствие все же очевидно. Приближенная модель (3.1.1) содержит параметр τ , тогда в системе для динамика средних, предложенной в работе (Paulsson et al.,

1998), он отсутствует. Для понимания этой разницы мы провели численные расчеты динамики среднего числа копий в соответствии с точной моделью (2.1.3) и сравнили их с решением уравнения (3.1.7). Результаты изображены на рис. 3.1.4.

Очевидно, что наша модель (непрерывная линия на рис. 3.1.4) описывает динамику среднего числа копий плазмиды в популяции микроорганизмов практически точно при $\tau \approx 0.8 - 0.9$, что таким образом подтверждает корректность приближения (3.1.11) для описания динамики точной модели (2.1.3). Однако столь высокое значение для τ отличается по порядку величины, оцененного для экспериментальных плазмид: анализ экспериментальных данных (Brownlie et al., 1990; Jones et al., 1980), проведенных в главе 2, показывает, что $\tau \ll 1$, и, следовательно, снижение средней копийности в реальных экспериментах происходит с гораздо меньшей скоростью, чем можно предположить из модели (3.1.11)

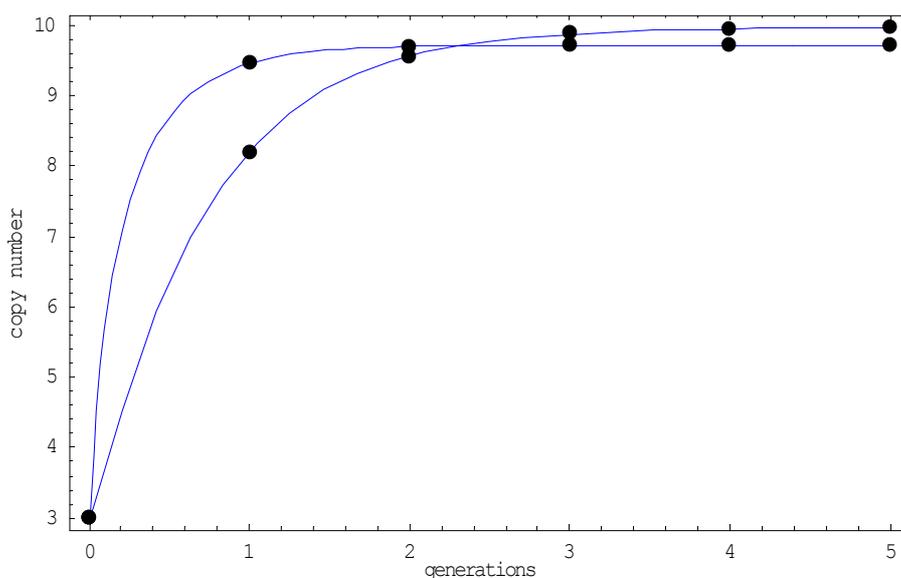


Рис. 3.1.4. Динамика средней копийности в популяции плазмидсодержащего штамма в соответствии с точной моделью (точки) и динамикой средних по модели (3.1.7) (непрерывная кривая). Параметры (остальные приведены в подписи к рис. 3.1.2): $\tau=0.85$, $x(0) \approx 3$ и $x(\infty) \approx 10$.

Причина этого несоответствия, возможно, заключается в том, что реальная динамика плазмид вовлекает ряд других параметров (например, средний размер бактериальной клетки), которые, изменяясь, также влияют на скорость снижения (увеличения) среднего числа копий плазмиды, не включенных в модель (3.1.9). Наша модель (3.1.7) содержит

феноменологический параметр τ , который и включает в себя неявным образом такие параметры. Заметим, что выбор функции $\lambda(x) \sim \tau$ обеспечивает правильное стационарное значение для средней копияности и верную динамику ее изменения (см. рис. 3.1.2).

Зная теперь, как динамика среднего числа плазмид в популяции микроорганизмов зависит от молекулярного механизма контроля копияности плазмид (на примере плазмиды ColE1), мы проанализируем динамику бактерий, содержащих плазмиду pBR322 (обладающую сходным с ColE1 контролем копияности) при длительном культивировании в хемостате.

Снижение селективного преимущества бесплазмидных клеток. Молекулярным генетикам хорошо известен экспериментальный факт снижения селективного преимущества бесплазмидных вариантов рекомбинантного штамма при длительном культивировании в неселективных условиях в хемостате (Brownlie et al., 1990; Jones et al., 1980; Печуркин и др., 1990; Брильков и др., 1990). Рассмотрим этот эффект поподробнее на данных (Jones et al., 1980). В этой работе авторы обнаружили высокую скорость элиминации плазмидсодержащих клеток из хемостата, если начальная культура содержала малое (0.01%) число бесплазмидных клеток (см. рис.3.1.5, кривая 1). Скорость элиминации плазмидсодержащего штамма была снижена, если начальный инокулят не содержал бесплазмидных вариантов (рис.3.1.5, кривая 2а). В противоположность такому поведению, стандартная математическая модель Левина-Стюарта (Stewart and Levin, 1977; см. главу 1 и 4), предсказывает неизменную скорость снижения числа плазмиднесущих клеток (рис.3.1.5, кривая 2б). Очевидно, это связано с фактом, что модель Левина-Стюарта описывает динамику только двух типов клеток: бесплазмидных и клеток с максимальным числом копий плазмиды, что автоматически предполагает идеальный контроль копияности плазмид, который мгновенно и необычайно точно корректирует отклонения числа копий в клетке от некоторого заданного среднего.

В реальности, однако, контроль копияности не является идеальным даже в случае экспоненциального механизма ингибирования (но даже и точный контроль копияности приводит к распределению плазмид в популяции микроорганизмов, см. след. часть), а, следовательно, *биологически корректная* модель должна учитывать вариацию числа копий плазмиды в клетках микроорганизмов. Последствия такого “учитывания” разительны (см. результаты главы 1 и 2), что, впрочем, не удивительно, т.к. копияность является важной характеристикой плазмид (Paulsson & Ehrenberg, 1998; Summers, 1996; Брода, 1982). Главное отличие распределенной модели (3.1.1), учитывающей “разнокопияность” плазмид

мидных штаммов, от модели Левина-Стюарта состоит в том, что параметры рекомбинантного штамма в распределенной модели, как, например, скорость роста популяции и вероятность образования бесплазмидной клетки при делении, теперь зависят от числа копий плазмиды на клетку, и, следовательно, не являются постоянными параметрами как в сосредоточенной (Левина-Стюарта) модели (исключая случай, когда копияность является постоянной величиной, что практически недостижимо (Paulsson and Ehrenberg, 1998)).

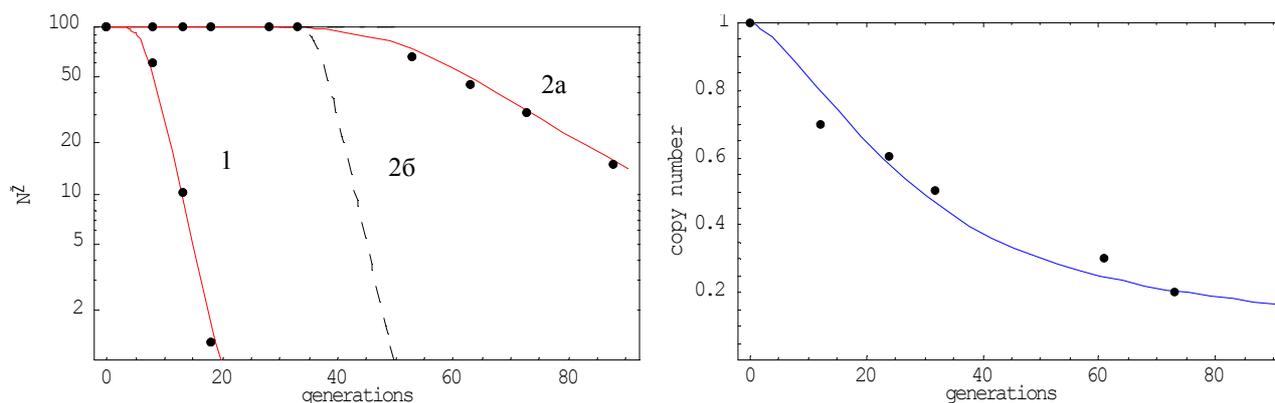


Рис. 3.1.5. Снижение селективного преимущества бесплазмидных вариантов плазмидсодержащего (pBR322) рекомбинантного штамма при длительном культивировании в неселективных условиях в хемостате (расчеты по модели (3.1.1)). Левый график: 1 - результат конкуренции бесплазмидного варианта и исходного рекомбинантного штамма при числе копий плазмиды в клетках $n = 35$ в начале культивирования. В начальный момент времени добавлено 0.01% бесплазмидных изогенных клеток; 2а - замещение исходного штамма бесплазмидным вариантом при длительном культивировании по модели (3.1.1), 2б - то же по модели Левина-Стюарта. Правый график - изменение среднего числа копий плазмиды в популяции плазмидсодержащего штамма по модели (3.1.1). Во всех расчетах полагалось: $\mu = (1 - \beta(i/n)^m) \cdot S / (1 + S)$, $m = 1.4$, $\tau = 2.5 \cdot 10^{-2}$ (рис. 2.2.3), $D = 0.25$ час $^{-1}$, $\lambda = \tau \rho k_{II} i \exp(-i/K)$ (экспоненциальный механизм ингибирования), $K = 0.56$, $\rho k_{II} = 2.5$ час $^{-1}$, $\beta = 0.67$. Точки - экспериментальные данные из (Jones et al., 1980).

В реальности копияность определенной клетки (впрочем как и среднее число копий плазмиды в популяции микроорганизмов) постоянно подвержена спонтанным изменениям, обусловленным неточностью контроля копияности репликации плазмид, случайностью сегрегации плазмид при делении и ряде других факторов, которые очевидно зависят от условий культивирования. Например, перенос растущих бактерий из одной среды (LB) в другую (минимальная DM или M9), часто связан с рядом метаболических перестроек, ведущих в частности к изменению средних размеров клеток и средней копияности в популяции плазмидсодержащих штаммов (Печуркин, 1978; Печуркин и др., 1990; Дебабов и Лифшиц, 1988; Brendel & Perelson, 1993; Churchward et al., 1982; Davis et

al., 1990; Lee & Bailey, 2000; Lin-Chao & Bremer, 1986; рис. 3.1.6).

Если мы предположим, что среднее число копий плазмиды pBR322 на клетку в популяции бактерий при культивировании в хемостате ($D = 0.1 \text{ час}^{-1}$) является небольшим (см. рис. 3.1.6), а в инокулянтной культуре ($D = 1.5 - 2 \text{ час}^{-1}$) повышенным, то это может объяснить снижение средней копийности плазмиды pBR322 в популяции рекомбинантного штамма при длительном культивировании в хемостате, как (Jones et al., 1980) и наблюдали (см. рис. 2.2.3 и рис. 3.1.5).

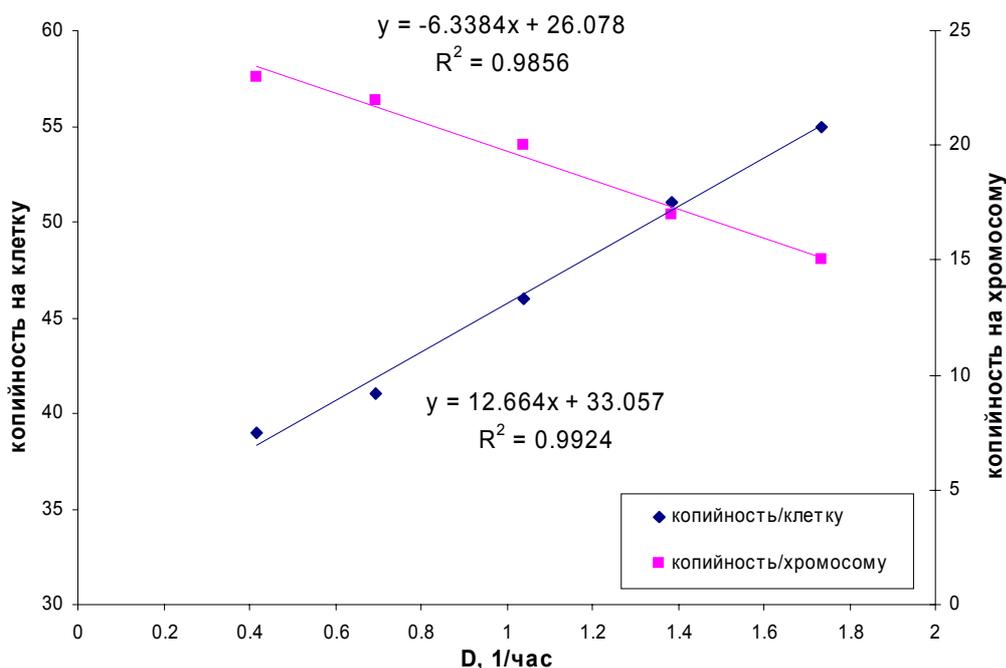


Рис. 3.1.6. Средняя копийность плазмиды pBR322 в *E.coli* Вг/А при росте на различных средах (т.е. с разной максимальной скоростью роста D). Число копий выражено либо в хромосомальном эквиваленте (квадрат) либо на клетку (ромб). Данные взяты из работы (Lin-Chao and Bremer, 1986).

Такое снижение может быть связано как со снижением среднего размера бактериальных клеток при низких скоростях роста (Akerlund et al., 1995; Churchward et al., 1982; Donachie, 1968; Tyson and Hannsgen, 1985a; Tyson and Hannsgen, 1986), так и с усилением транскрипции ингибиторной молекулы RNAI при увеличении времени генерации (Atlung et al., 1999; Keasling et al., 1995; Keasling and Palsson, 1989; Lin-Chao and Bremer, 1986; Lin-Chao and Bremer, 1987). Учитывая этот факт и предполагая нелинейную связь между удельной скоростью роста популяции плазмиднесущих бактерий и копийностью в клетках $\mu(x) \sim 1 - \beta x^m$ (см. выражение (2.1.6)), с помощью математической модели (3.1.1) мы попытались описать динамику снижения средней копийности и уменьшения фракции плаз-

мидсодержащих клеток в популяции бактериального штамма при длительном культивировании в хемостате на основе данных (Jones et al., 1980).

Как впрочем мы и ожидали (см. рис. 3.1.7), математическая модель (3.1.1) (а значит и обобщенная модель (2.2.4)) достаточно точно описывает изменение среднего числа копий плазмиды pBR322 в популяции плазмидсодержащих бактерий, как и было получено ранее с использованием решения (2.2.17) приближенной непрерывной модели (2.2.4) (см. рис. 2.2.3)⁴ и уравнения (3.1.7) дискретной модели (3.1.1).

Более того, динамическая замена исходно гомогенного плазмиднесущего штамма (или смешанной популяции “плазмидных-бесплазмидных” клеток) на бесплазмидный вариант также происходит достаточно близко к динамике, предсказываемой численным решением модели (3.1.1). Отметим, что мы так и не смогли достичь того же результата с помощью модели Левина-Стюарта (рис. 3.1.5, кривая 2б) по причинам, объясненным выше. Мы также нашли интригующим, что наиболее правдоподобная регрессия модели (3.1.1) к данным (Jones et al., 1980) осуществляется при $m > 1$, что в принципе означает нелинейную зависимость “стоимости” плазмиды (селективного коэффициента рекомбинантного штамма) от копийности бактериальных клеток. Этот результат также следует из следующей цепочки простых рассуждений. Селективный коэффициент пропорционален тангенсу угла наклона кривой z в логарифмических координатах при $z \gg 1$, где $z = p - / p +$ - отношение концентрации бесплазмидных клеток к концентрации плазмидсодержащих клеток (см. главу 4). Оценка селективного коэффициента в начале и конце культивирования дает соответственно значения $\alpha_1 \approx 0.68$ и $\alpha_2 \approx 0.09$ (с изменением $\alpha_1/\alpha_2 \approx 8$). Сравнение изменения относительной средней копийности (x_1/x_2) дает отношение приблизительно равное 5. Таким образом, снижение копийности в 5 раз приводит к снижению селективного преимущества в 8 раз, следовательно, т.к. $x_2/x_1 \neq \alpha_2/\alpha_1$, зависимость селективного коэффициента от копийности должна быть нелинейной, что и соответствует полученному с помощью математической модели выводу. Суммируя, мы заключаем, что математическая модель (3.1.1) действительно подтверждает, что факт снижения селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании рекомбинантных штаммов в хемостате есть прямое следствие уменьшения среднего количества копий плазмиды (на клетку) в популяции микроорганизмов.

⁴ Отличие параметра τ ($\tau=0.03$ на рис. 2.2.3 вместо $\tau=0.025$ на рис. 3.1.5), связано с фактом, что регрессия (2.2.7) была использована в приближении $\beta=0$ (см. рис. 2.2.4).

3.2. Анализ дискретной модели: стационарные распределения, оценка параметров модели и их приложение к стабильности плазмид.

На нескольких примерах мы продемонстрировали, что приближенная модель (3.1.1) достаточно точно описывает как динамику среднего числа копий плазмиды в популяции, так и изменение численности (фракции) плазмидсодержащих и бесплазмидных клеток при длительном культивировании. Однако так как модель (3.1.1) также предназначена и для описания динамики *распределения* клеток с различной копийностью, в этой части мы проанализируем информацию, которую можно получить из знания стационарных⁵ распределений, которые к настоящему времени были экспериментально определены для ряда плазмид (Ayala-Sanmartin and Gomez-Eichelmann, 1989; Bailey et al., 1983; Lobner-Olesen, 1999; Srienc et al., 1986; Tseng et al., 1997).

Стационарные распределения. Изменение среднего числа копий плазмиды $x(t)$ в популяции плазмидсодержащих микроорганизмов подчиняется уравнению (3.1.5) и в стационарном состоянии находится из уравнения (3.1.8), что в явном виде выражается как:

$$n = K \ln(\theta), \quad (3.2.1)$$

$$n = K(\theta - 1), \quad (3.2.2)$$

для экспоненциального (3.2.1) или гиперболического (3.2.2) механизмов ингибирования с $\theta = \rho k_{II} / D$ (см. выражение (3.1.12)). Используя модель (3.1.2) и метод нахождения динамики средних (3.1.3) - (3.1.4), продемонстрированный ранее на вычислении динамики среднего числа копий в распределенной модели (3.1.1), мы находим уравнение на второй момент $\mu = \sum_i i^2 p_i$ распределения плазмид в микробной популяции:

$$\dot{\mu}(t) = \sum_i \lambda_i p_i(t) + x(t) + 2 \left[\sum_i i \lambda_i p_i(t) - \mu(t) \right], \quad (3.1.3)$$

где $x(t)$ описывает изменение средней копийности. Тогда вариационный коэффициент CV стационарного распределения \tilde{p}_i , который определяет относительную “ширину” распре-

⁵ или квази-стационарных, если быть точным.

деления, находится из выражения:

$$CV = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{n} = \frac{\sqrt{\mu - n^2}}{n} = \sqrt{\sum_i i \lambda_i \frac{\tilde{p}_i}{n^2} + \frac{1}{n} - 1}. \quad (3.1.4)$$

Стационарное распределение клеток в популяции с различным числом копий плазмиды мы получаем из уравнения (3.1.2) при $\dot{X} = 0$, или:

$$\left(i + \frac{\lambda_i}{\tau D} \right) \tilde{p}_i = (i+1) \tilde{p}_{i+1} + \frac{\lambda_{i-1}}{\tau D} \tilde{p}_{i-1}. \quad (3.2.5)$$

Напомним, что $p_i = X_i/X$ (см. модель (3.1.2)). То, что $\lambda_i = \tau \rho k_{II} Q(i/K)$, означает, что функция $\lambda_i/(\tau D)$ зависит только от двух составных параметров $\theta = \rho k_{II}/D$ и $K = \varepsilon_I k/k_I$ (см. выражения (3.1.12)-(3.1.13)). Следовательно, определяя среднее число копий n и дисперсию числа копий плазмиды σ^2 (или вариационный коэффициент CV) в экспериментальной популяции плазмидсодержащих микроорганизмов, мы можем определить два важных параметра: θ , характеризующий эффективность процесса репликации плазмиды по сравнению с удельной скоростью роста популяции микроорганизмов (или, более точно, число успешных транскрипций молекулы RNAII с одной плазмиды за клеточный цикл) и K , связанный с эффективностью ингибирования пре-прайма RNA II ингибиторной молекулой RNA I.

Для нахождения коэффициента вариации CV^6 , нам также необходимо знание стационарного распределения \tilde{p}_i , заданного уравнением (3.2.5). Подробные алгебраические расчеты показывают, что для произвольного λ_i стационарное распределение \tilde{p}_i определяется выражением:

$$\tilde{p}_i = \frac{\tilde{p}_1}{i} \left\{ 1 + \frac{1}{\tau D} \sum_{j=1}^{i-1} \prod_{k=j}^{i-1} \frac{\lambda_k}{k} \right\}, \quad (3.2.6)$$

⁶ $CV = \sqrt{\sum_i i^2 \tilde{p}_i - n^2} / n$

где константа \tilde{p}_1 находится из “нормировки” $\sum_{i=0}^{\infty} \tilde{p}_i = 1$. Стационарные распределения клеток с различным числом плазмид, рассчитанные в соответствии с (3.2.6) для гиперболического и экспоненциального механизмов ингибирования, приведены на рис. 3.2.1.

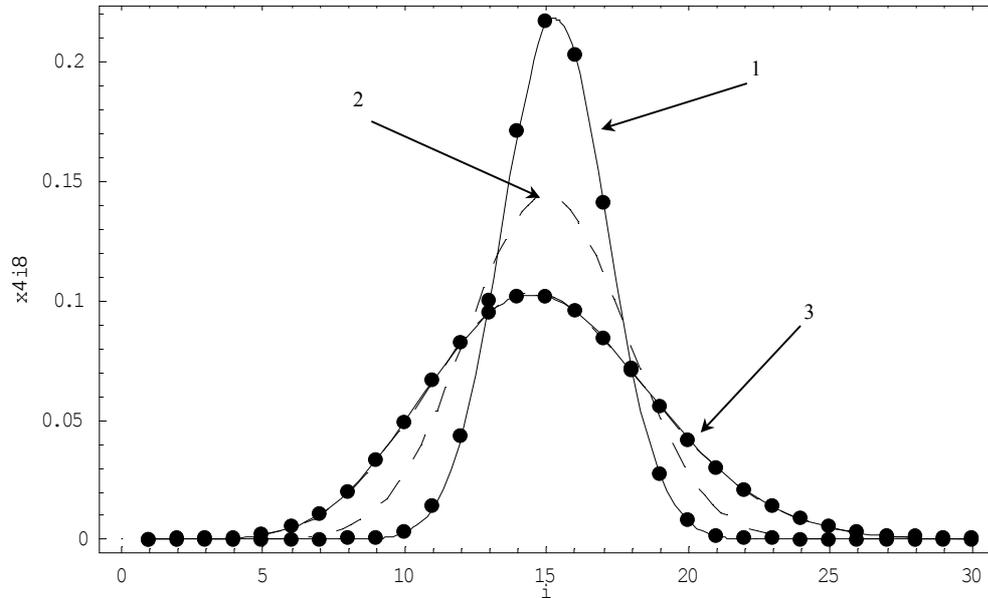


Рис. 3.2.1. Стационарные распределения клеток с различным числом копий плазмиды при разных механизмах ингибирования репликации плазмид в соответствии с решением (3.2.6) приближенной математической модели (3.1.1). 1- экспоненциальный механизм ингибирования, 2- тоже в точной модели (2.1.3), 3 - гиперболический механизм ингибирования. $n = 15$, $\theta = 100$, K находится из уравнений (3.2.1)-(3.2.2).

Как впрочем мы и ожидали, дисперсия стационарного распределения при экспоненциальном ингибировании оказалась гораздо меньше, чем при гиперболическом (рис. 3.2.1). Этот результат, таким образом, в очередной раз подтверждает увеличенную стабильность плазмид с экспоненциальным механизмом ингибирования, которая в основном связана с малой дисперсией стационарного распределения (Paulsson and Ehrenberg, 1998; Summers, 1996). В дополнение отметим, что при достаточно большой средней копийности (на рис. 3.2.1 $n=15$) стационарное распределение (3) при гиперболическом механизме ингибирования совпадает с теоретически предсказываемым распределением Пуассона

$$p_i = \frac{n^i}{i!} \exp(-n) \quad (\text{см. выражение (2.1.10)}) \quad \text{а, следовательно, не зависит от } \theta.$$

С другой стороны, распределение (1) на рис. 3.2.1, вычисляемое в приближенной модели (3.1.1) при экспоненциальном механизме ингибирования репликации плазмид, отличается от предсказания точной модели (2.1.3), изображенного на рис. 3.2.1 (кривая (2)),

которое при $\theta \gg 1$ дается биномиальным распределением (2.1.4). Очевидно это связано с тем, что точная модель не учитывает скорости репликации плазмид в клетке, которая возрастает многократно при больших θ . Если скорость репликации плазмид велика ($\theta \gg 1$), то в стационарном состоянии будет много клеток с копийностью, близкой к средней, и единицы с копийностью больше (меньше) средней, что мы и наблюдаем на рис. 3.2.1. Таким образом мы заключаем, что приближенная модель (3.1.1) описывает *наблюдаемое* распределение клеток с различным числом копий, а следовательно стационарное распределение (3.2.6), основанное на приближенной модели, может быть применено для оценки параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов *in vivo*, к которой с помощью выражений (3.2.1), (3.2.2), (3.2.4) и (3.2.6) мы окончательно готовы приступить.

Оценка параметров плазмиднесущих бактерий *in vivo*. Регуляция контроля копийности плазмид R1 и ColE1 была изучена достаточно детально в ряде экспериментальных работ, в основном группами под руководством К. Нордстрема (R1) и Д. Томизавы (ColE1) (Nordstrom et al., 1984; Summers, 1996; Tomizawa, 1990b), и суммировано в (Actis et al., 1998; Summers, 1996).

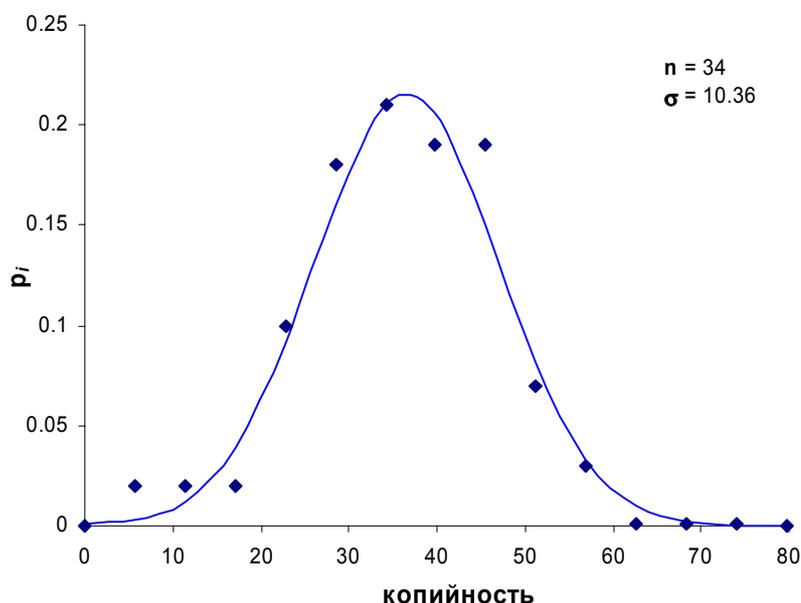


Рис. 3.2.2. Стационарное распределение клеток с различным числом копий плазмиды. Обработано из данных (Ayala-Sanmartin and Gomez-Eichelmann, 1989). Точки - экспериментальные данные, непрерывная кривая - нормальное распределение. Средняя копийность $n = 34$, стандартное отклонение $\sigma = 10.36$ ($CV = 0.31$).

Многие кинетические параметры контроля репликации плазмиды ColE1 были определены как экспериментально (Brenner and Tomizawa, 1991), так и теоретически (Brendel

and Perelson, 1993; Perelson and Brendel, 1989). И хотя большинство этих работ было проведено *in vitro*, у нас нет особых оснований полагать, что *in vivo* параметры отличаются значительно от параметров, измеренных *in vitro* (Atlung et al., 1999; Summers, 1996). Тем не менее, используя известные стационарные распределения клеток с различным числом копий плазмиды (Ayala-Sanmartin and Gomez-Eichelmann, 1989; Lobner-Olesen, 1999) мы оценим особо важный параметр θ , и сравним его со значениями, измеряемыми ранее.

Для этой цели (оценки параметра θ), мы используем два набора данных (Ayala-Sanmartin and Gomez-Eichelmann, 1989) и (Lobner-Olesen, 1999), изображенных на рис. 3.2.2 и рис. 3.2.3. Так как все уравнения, описывающие стационарные распределения и центральные моменты в общем случае являются существенно нелинейными, мы применим простейший алгоритм для расчета параметров θ и K .

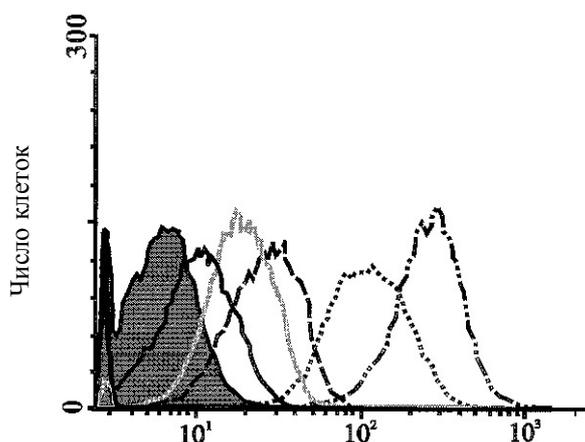


Рис. 3.2.3. Стационарное распределение клеток с различной копийностью плазмиды (измерянное по флуоресценции протеина GFP) в популяции плазмидсодержащих микроорганизмов (из (Lobner-Olesen, 1999)). Закрашенное распределение - плаزمида F, непрерывная линия - R1, серая - pSC101, штрихованная - P1ΔincA, пунктирная - p15A, штрихпунктирная - pBR322.

Вычисления проводятся по следующей схеме. Для известной средней копийности n (которая оценивается из экспериментального распределения) мы выбираем некоторое произвольное значение θ ($\theta > 1$) и вычисляем соответствующую константу ингибирования $K = n / \ln(\theta)$ (для экспоненциального ингибирования) или $K = n / (\theta - 1)$ (для гиперболического). Следующим шагом из известных θ, n, K мы рассчитываем теоретическое стационарное распределение клеток с различным числом копий плазмиды (3.2.6) и соответственно оцениваем вариационный коэффициент CV (либо из выражения (3.2.4), либо

прямо из распределения (3.2.6)). Если полученный коэффициент CV меньше (больше) определенного экспериментально, мы уменьшаем (увеличиваем) значение θ на константу и опять вычисляем CV по той же схеме. Эта процедура повторяется пока теоретическое и экспериментальное значения коэффициента вариаций CV не совпадут. Значение θ , при котором это произойдет, и является искомым параметром. Тогда константа K вычисляется согласно уравнениям (3.2.1) - (3.2.2), что и завершает определения трех основных параметров θ, n, K . Результаты подобных расчетов для данных, изображенных на рис. 3.2.2 - 3.2.3, суммированы в табл. 3.2.1.

Как видно из табл. 3.2.1, параметр θ , оцененный *in vivo* из стационарных распределений, оказался достаточно близким к единице⁷. Это, в частности, означает, что скорость репликации плазмид является порядка скорости “разбавления” плазмид из-за деления плазмидсодержащих клеток, т.е. $\rho k_{II} \sim D$. Другими словами, среднее число репликации плазмиды за одно клеточное деление равняется одному (с достаточно большой дисперсией). Сравнение с данными, полученными в работе (Brenner and Tomizawa, 1991), показывает, что наша оценка, основанная на анализе стационарных распределений, является значительно заниженной: $\theta = \rho k_{II} / D < 2$, тогда как значения *in vitro*: $k_{II} / D > 3$. К сожалению мы не знаем, чем эта разница может быть вызвана, а здесь предложим одно из возможных объяснений.

	(Ayala-Sanmartin, 1989) pIO1	(Lobner-Olesen, 1999), pBR322	(Brenner and Tomizawa, 1991) pNT205
N	33.70 ± 2.77	42.80	15
CV	0.31 ± 0.04	0.46	-
θ	1.48 ± 0.08	1.25	3-20 (k_{II} / D)
K	80.02 ± 10.33	152.37	-

Таблица 3.2.1. Измеренные *in vivo* параметры стационарных распределений клеток с различной копийностью (n, CV) и параметры, оцененные из модели (3.1.1) с использованием экспоненциального механизма ингибирования репликации плазмид (θ, K). Все рассмотренные плазмиды обладают сходным контролем копийности плазмиды ColE1.

⁷ при $\theta < 1$ плазмиды не будут поддерживаться в популяции микроорганизмов из-за недорепликации, и, в конце концов, потеряются при длительном культивировании.

Для этого вспомним физический смысл константы θ . Параметр $\theta = \rho k_{II} / D$ - это число успешных репликаций плазмиды за клеточный цикл, где k_{II} - скорость инициации транскрипции RNAII, ρ - вероятность того, что полноценный препраймер приведет к репликации плазмиды и D - скорость роста популяции микроорганизмов. Экспериментально константы k_{II} и D измеряются достаточно легко, тогда как ρ нет. Более того, как раз отношение k_{II} / D часто рассматривается как эффективность репликации плазмид. Например, Бреннер и Томизава оценили этот параметр равный 6 (Brenner and Tomizawa, 1991).

Снижение эффективности репликации плазмид через уменьшение ρ может быть возможным механизмом наблюдаемого дисперсного распределения при малых θ (рис. 3.2.2 и рис. 3.2.3). Одной из причин снижения эффективности репликации плазмид при культивировании *in vivo* возможна конкуренция между РНК и ДНК полимеразы при одновременной транскрипции и репликации плазмидных генов. То, что при усиленной экспрессии плазмидных генов стабильность плазмид и часто копияность уменьшаются, было обнаружено в нескольких экспериментальных работах, но так и не получило широкого распространения (Bentley et al., 1990; Bugeja et al., 1989; Duetz and van Andel, 1991; Duetz et al., 1991; Lee and Edlin, 1985; Nguyen et al., 1989; Stueber and Bujard, 1982). Например, как показывает анализ данных (Wouters et al., 1980) с помощью математической модели (3.1.1), этот эффект действительно может вести к снижению стабильности плазмидсодержащих штаммов при длительном культивировании в хемостате, обеспечивая таким образом малость параметра θ и высокую дисперсность стационарного распределения клеток с различной копияностью. Полученные оценки на параметры θ и K , таким образом, представляют минимально возможные значения для плазмиды pBR322. Также предполагая $k_{II} / D \approx 10$ (Brenner and Tomizawa, 1991), мы оцениваем вероятность (эффективность) репликации плазмид равной $\rho \approx 0.1 - 0.15$, означающий, что только один-два полноценных праймера для ДНК полимеразы из 10, образованных на плазмиде, ведут к успешной репликации.

Альтернативным (и возможно также верным) объяснением может являться факт того, что параметры рекомбинантных штаммов не являются постоянными, в противоречие нашим первоначальным “модельным” предположениям, где мы также пренебрегли существенной вариабельностью клеток микроорганизмов, которые могут различаться по ряду признаков - размеру, весу, составу протеинов и т.п. Эти упрощения возможно и являются причиной столь низкой оценки для эффективности репликации плазмид θ .

Более того, тщательный анализ данных (Lobner-Olesen, 1999) и многих других (Bailey et al., 1983; Srienc et al., 1986; Tseng et al., 1997) показывает, что кроме высокой дисперсии стационарных распределений, верной для подавляющего большинства данных и измеренных различными методами, все известные экспериментальные распределения не являются нормальными (т.е. нормально распределенными), а скорее лог-нормальными (см. рис.3.2.3). В противоречие этим наблюдениям, простая математическая модель (3.1.1), как впрочем и все модели, предложенные к настоящему времени, предсказывает симметричное стационарное распределение клеток с различной копийностью (см. рис. 3.2.1). Такое принципиальное различие до сих пор не получило общего объяснения (К. Nordstrom, персональное сообщение), хотя ряд частичных объяснений было предложено. Например, наличие гена *copB* в составе плазмиды R1 приводит к увеличению скорости репликации плазмид при наличии 1-2 копий плазмиды на клетку, что в свою очередь ведет к уменьшению фракции клеток с низким содержанием плазмидной ДНК (К. Nordstrom, персональное сообщение), и что, соответственно, приводит к несимметричности распределения клеток с различным числом плазмид. Этот механизм, однако, не объясняет наличия клеток с необыкновенно высокой копийностью. Мы полагаем, что другой эффект может также быть ответственен за такую необычность стационарного распределения клеток с различной копийностью плазмиды, а именно наличие клеток микроорганизмов с разными клеточными объемами.

Распределение клеток (как прокариотических, так и эукариотических) по размерам, которое может быть измерено с использованием проточной цитометрии, было экспериментально найдено в 60-х; наиболее точно такое распределение описывается как лог-нормальное (Harvey et al., 1967). Построение простых (Donachie, 1968) и достаточно сложный математических моделей (Tyson, 1989; Tyson and Diekmann, 1986; Tyson and Hannsgen, 1985a; Tyson and Hannsgen, 1985b; Tyson and Hannsgen, 1986) не только позволило продемонстрировать однозначную связь между скоростью роста популяции микроорганизмов и средним размером растущих клеток, но и показать, что “лог-нормальность” стационарного распределения клеток с различным объемом (массой) есть прямое следствие соединения стохастического клеточного цикла (Brooks et al., 1980; Smith and Martin, 1973) и процесса экспоненциального роста бактериальной (или эукариотической) клетки (Harvey et al., 1967; Kubitschek, 1986). Таким образом, вариация времени деления клеток приводит к наличию (причем стабильному) клеток с различным объемом (Tyson and Hannsgen, 1985a). Экспериментально измеренный коэффициент вариаций для такого рода распределения

“разнообъемных” клеток составляет 20-50% (Harvey et al., 1967; Lobner-Olesen, 1999), что, следовательно, должно быть учтено в модели (3.1.1). *Но как объем бактериальной клетки связан с числом копий плазмиды в этой клетке?*

Чтобы ответить на этот вопрос, вспомним как плазмиды регулируют свою копияность (что мы рассмотрим на примере негативного контроля копияности). Репликация плазмиды осуществляется в основном с помощью *cis*-действующего протеина (или RNA, как в случае плазмид pBR322 и ColE1), часто называемого *rep*-протеином, который синтезируется с постоянной скоростью (ColE1) либо регулируется (R1) (Summers, 1996). С другой стороны, успешная репликация плазмиды ингибируется антисенсными *trans*-действующими молекулами, преимущественно RNAs, которые обычно производятся с постоянной скоростью (Summers, 1996). Следовательно репликация определенной плазмиды определяется локальной концентрацией как реплицирующего белка так и ингибиторной молекулы. Концентрация, как известно из курса физики, определяется числом молекул в клетке, деленное на ее объем. Тогда в большой клетке с малым (начальным) числом копий плазмиды, локальная концентрация ингибитора будет малой (число молекул \sim числу плазмид), тогда как локальная концентрация *rep*-белка, специфичного к конкретной плазмиде, будет примерно постоянной (из-за *cis*-действующего механизма). Это различие в концентрациях ингибитора и “*rep*-протеина” в конце концов приведет к увеличению числа копий плазмиды в клетке с большим объемом. Подобный аргумент показывает, что в клетке с маленьким объемом число плазмид не будет увеличиваться в основном из-за увеличенной локальной концентрации антисенсной молекулы. Суммируя, мы получаем, что клетки в популяции микроорганизмов, обладающие сравнительно небольшим объемом, будут содержать относительно малое число плазмид, тогда как клетки с большим объемом могут увеличить копияность до экстремальных значений. То, что увеличение объема клеток ведет к увеличению средней копияности, в частности отражено на рис. 3.1.6, где увеличение числа копий плазмиды/клетку связано с увеличением среднего объема бактериального штамма (Churchward et al., 1982). Может ли этот механизм объяснить несимметричность распределения клеток с различным числом копий плазмиды и имеет ли смысл этот простой вербальный аргумент? Проанализируем эту гипотезу с помощью простейшей математической модели.

Пусть стационарное распределение клеток с различной копияностью (условная вероятность обнаружить клетку с i плазмидами при клеточном объеме v) описывается распределением Пуассона (это верно для ColE1 при гиперболическом механизме ингибиро-

вания и видимо для R1 (Nordstrom et al., 1984; Paulsson et al., 1998)), данное выражением (2.1.11) или

$$f_0(i|v) = \frac{(n)^i}{i!} \exp(-n) = \frac{(\gamma v)^i}{i!} \exp(-\gamma v) \quad (3.2.7)$$

где n - среднее число копий плазмиды в популяции микроорганизмов, v - объем клетки (мы предположили линейную связь между объемом клетки и средней копийностью), γ - коэффициент пропорциональности. Распределение $f_0(i|v_0)$ эквивалентно распределению клеток с различным числом копий плазмиды, изображенное на рис. 3.2.1, при условии что все клетки обладают идентичным объемом v_0 . Пусть теперь каждая клетка может иметь разный объем, заданным плотностью вероятности в виде гамма распределения:

$$p(v) = \frac{v_0}{\sigma^2} \frac{\left(\frac{v_0}{\sigma^2} v\right)^{v_0^2/\sigma^2 - 1}}{\left(\frac{v_0^2}{\sigma^2} - 1\right)} \exp\left(-\frac{v_0}{\sigma^2} v\right), \quad (3.2.8)$$

где v_0 соответствует среднему объему и σ^2 - дисперсия объема в микробной популяции. Мы выбрали гамма распределение, так как оно наиболее просто и точно отражает лог-нормальность распределения клеток с различными размерами (Anderson et al., 2000; Tyson and Hannsgen, 1985a). Тогда *наблюдаемое* стационарное распределение клеток с различным числом копий плазмиды в популяции микроорганизмов дается следующей сверткой:

$$f(i) = \int_0^{\infty} f_0(i|v) p(v) dv = \frac{\Gamma(i+b^2)}{i!(b^2-1)!} \cdot \frac{\gamma^i a^{b^2}}{(\gamma+a)^{i+b^2}}, \quad (3.2.9)$$

где $a = v_0/\sigma^2$ и $b = v_0/\sigma$. Это распределение может быть очень дисперсным (см. рис. 3.2.4) при больших σ . Например, при $v_0 \approx \sigma$ мы находим

$$f(i) = \frac{n^i}{(n+1)^{i+1}}, \quad (3.2.10)$$

где $n = \mathcal{W}_0$ - средняя копияность в популяции микроорганизмов. Выражение (3.2.10) показывает, что хотя и средняя копияность не изменяется при трансформации (3.2.9), дисперсия распределения (3.1.10) равняется $\sigma_f^2 = n^2 + n$, т.е. пропорциональна вариации размера клеток (единице).

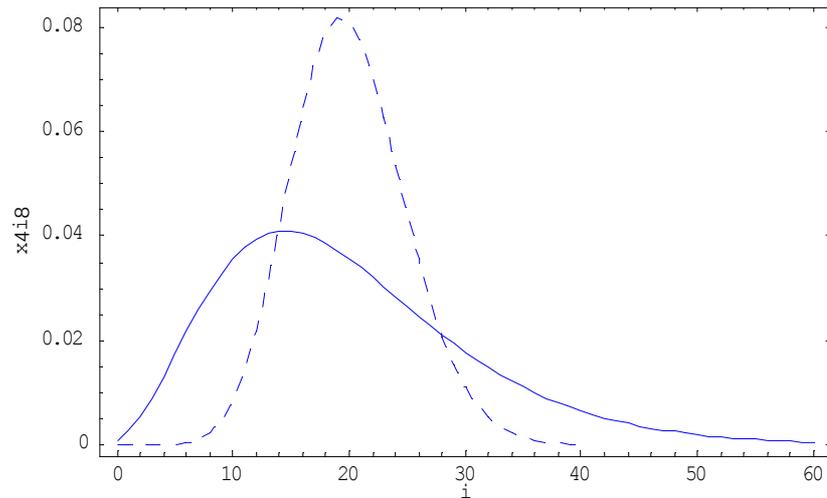


Рис. 3.2.4. Стационарное распределение клеток с различным числом копий плазмиды при гиперболическом механизме ингибирования репликации плазмид, заданное выражением (3.2.9). $n = 20$, $\gamma = 0.1$, $\nu_0 = 200$. Штрихованная линия - $CV = 10\%$ ($\tau_0 \approx 1.45 \cdot 10^{-4}$), непрерывная - $CV = 50\%$ ($\tau_0 \approx 1.18 \cdot 10^{-2}$).

На рис. 3.2.4 изображено типичное распределение клеток с разным числом копий плазмиды при учете “разброса” клеток по размерам. Распределение плазмидсодержащих клеток при вариации клеточного размера до 50% достаточно точно отражает экспериментально наблюдаемые распределения, в частности изображенное на рис. 3.2.3 (заметьте, что распределения на рис. 3.2.3 даны в логарифмических координатах по оси абсцисс). Таким образом, мы показали, что несимметричность стационарных распределений плазмиднесущих штаммов микроорганизмов может быть связана с наличием клеток с различными объемами. Этим мы также подчеркиваем, что малость оцененного параметра θ (или, что тоже самое, дисперсия стационарного распределения) может не иметь ничего общего с точностью контроля копияности репликации, а определяется просто стохастичностью процесса деления клеток микроорганизмов (и как следствие высокодисперсным распределением клеток по объемам).

Механизмы сегрегационной нестабильности плазмид. Стабильное наследование

плазмид в популяции рекомбинантного штамма определяется в основном двумя факторами - скоростью образования бесплазмидных клеток при делении плазмидсодержащих и разницей в удельных скоростях роста плазмиднесущих и бесплазмидных вариантов. Последний фактор является своего рода усилителем, ускоряющим процесс элиминации плазмидсодержащих штаммов при условии, что бесплазмидная клетка образовалась и начала продуктивно делиться. Следовательно, условия, влияющие на скорость образования бесплазмидных клеток, являются наиболее существенно влияющими на общую стабильность плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов и требуют особого рассмотрения.

Первый, и возможно наиболее важный фактор в стабильном наследовании плазмид - это механизм распределения копий плазмиды между дочерними клетками при делении материнской. Очевидно, что равное распределение обеспечивает гораздо более высокую стабильность, чем случайное (при всех прочих равных условиях). Это не удивительно, что большинство малокопийных плазмид обладают системами активного распределения плазмид между дочерними клетками (Austin and Nordstrom, 1990; Williams and Thomas, 1992), так как при случайном распределении плазмиды были бы потеряны за несколько поколений (вероятность образования бесплазмидной клетки дается выражением 2^{1-i} , где i - число плазмид при делении материнской клетки). С другой стороны, многокопийные плазмиды (с копийностью 30-50 копий на клетку) не нуждаются в такой системе активного распределения, т.к. вероятность образования бесплазмидной клетки является порядка $\sim 10^{-9}$ (при $i = 30$), что и обеспечивает достаточную стабильность плазмидсодержащих штаммов даже при длительном культивировании (Summers, 1991; Summers, 1996).

Однако наличие определенного механизма сегрегации (точного либо случайного) не обеспечит высокую стабильность плазмидсодержащих микроорганизмов, если репликация плазмид не происходит достаточно эффективно. Здесь второй фактор начинает играть существенную роль, а именно точность (или эффективность) контроля копийности плазмид. Эффективность контроля копийности определяется способностью плазмид "выравнивать" свое число до некоторого фиксированного значения (определяемого условиями культивирования). Заметим, что в этом смысле экспоненциальный механизм ингибирования репликации плазмид является более точным, чем гиперболический (см. рис. 2.1.2 и (Ehrenberg, 1996; Paulsson and Ehrenberg, 1998)). И хотя экспоненциальный механизм ингибирования регулирует копийность достаточно эффективно, он тоже не является идеальным, т.к. идеально точный контроль копийности всегда обеспечивает репликацию

плазмид в клетке до определенного значения не зависимо от начального числа плазмид (т.е. если в начале клеточного цикла в клетке было $1, 2, \dots, m < n$ копий плазмиды, то в конце клеточного цикла в клетке будет точно n плазмид).

Неидеальный (неточный) механизм репликации плазмид приводит к образованию клеток с малым числом копий плазмиды к концу клеточного цикла и, следовательно, увеличивает вероятность образования бесплазмидных вариантов при делении (Nordstrom et al., 1984; Paulsson and Ehrenberg, 1998; Summers, 1991; Summers, 1996). Это утверждение верно как для плазмид с точной, так и со случайной сегрегацией плазмид при делении, хотя и в случае точной сегрегации даже не очень эффективный контроль копийности (например, модель “ $+n$ репликаций”) обеспечивает высокую сегрегационную стабильность плазмиды (Nordstrom et al., 1984). Таким образом, точная регуляция отклонений числа плазмид в клетке от некоторого среднего является важной характеристикой в сегрегационной стабильности плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов. Из этих рассуждений также следует, что неточность контроля копийности может быть причиной сегрегационной нестабильности рекомбинантных микроорганизмов-сверхпродуцентов, где эффективная транскрипция плазмидных генов приводит к снижению числа успешных репликаций плазмиды (определяемое параметром ρ) и соответственно к образованию малокопийных клеток. Но будет ли плаزمид стабильно поддерживаться в популяции микроорганизмов, если контроль ее копийности был бы идеальным (например, при наличии нескольких независимо действующих репликационных систем, как, например на плазмиде F)? Ответ на такой вопрос был бы положительный, если бы не другие факторы, также влияющие на сегрегационную стабильность.

Одна из удивительных особенностей рекомбинантных (и иногда природных) плазмид — это образование мультимеров (Summers et al., 1985; Summers and Sherratt, 1984). Например, отсутствие специального сайта на плазмиде pBR322, названного *cer* (ColE1 resolution) и ответственного за “расщепление” димеров, тримеров и прочих мультимеров с помощью кодируемых клеткой ферментов XerCD, ArgR и RepA (Colloms et al., 1990; Hodgman et al., 1998; Summers, 1998; Summers, 1996), приводит к снижению эффективного числа сегрегирующих при делении единиц (мономеров, димеров и т.д.), а следовательно к увеличению сегрегационной нестабильности плазмидсодержащих микроорганизмов. Например, если 30 копий плазмиды образуют 15 димеров, то вероятность образования бесплазмидного варианта увеличивается от $2^{1-30} \approx 10^{-9}$ до $2^{1-15} \approx 10^{-5}$, что приводит к достаточно быстрой сегрегации плазмид. Очевидно, что для появления бесплазмидного варианта, достаточно

только нескольким плазмидсодержащим клеткам образовать димеры перед делением, а следовательно снизить эффективное число независимо сегрегирующих при делении единиц в два раза. Локус *cer* как раз и способствует усилению сайт специфической рекомбинации между димерами с их последующей мономеризацией. Этот процесс наиболее ярко выражен в клетках бактерий с нормально функционирующей рекомбиназой XerCD, но не эффективен, например, в *sbcA*, *recBC*, *recA* штаммах (Summers and Sherratt, 1984). Таким образом, образование мультимеров может существенно увеличить нестабильность рекомбинантных штаммов микроорганизмов (Boe and Tolker-Nielsen, 1997; Summers, 1993; Summers, 1994; Summers et al., 1993), даже при высокоэффективном контроле копийности. С другой стороны, клонирование локуса *cer* (или подобного, идентифицированного для многих плазмид) или трансформация плазмиды в рекомбиназо-компетентный штамм приведет к восстановлению исходной стабильности плазмиды, достигнутой при мономеризации всех плазмидных копий.

Однако даже при идеально регулируемом контроле копийности и присутствии всех плазмид в мономерной форме различие клеток в объемах может также играть существенную роль в сегрегационной стабильности плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов. Как мы показали выше, клетки с малым объемом будут в среднем содержать гораздо меньше копий плазмиды, чем клетки с большим объемом, а следовательно такие “малыши” очень быстро приведут к образованию бесплазмидных вариантов. Например, для данных, приведенных на рис. 3.2.4, вероятность образования бесплазмидной клетки при делении плазмидсодержащей τ_0 в случае “узкого” стационарного распределения клеток с различной копийностью ($CV = 10\%$) определяется как $\tau_0 \approx 1.45 \cdot 10^{-4}$, тогда как при $CV = 50\%$ эта вероятность увеличивается на два порядка $\tau_0 \approx 1.18 \cdot 10^{-2}$.

Отметим, что процесс образования малокопийных клеток (из-за малости клеточного объема) будет возможен, даже если все плазмиды являются мономерами, а контроль копийности - идеальным. Такой разброс в клеточных размерах связан в основном со стохастикой (непостоянностью) времени деления клеток микроорганизмов (из-за вариабельности фазы G_1 (для бактерий B)), что было неоднократно подчеркнуто в ряде работ (Bernander and Nordstrom, 1990; Brooks, 1981; Brooks et al., 1981; Eliasson et al., 1996; Smith and Martin, 1973; Tyson, 1989; Tyson, 1991; Tyson and Hannsgen, 1985a; Tyson and Hannsgen, 1986). Это в частности означает, что распределение клеток с разной копийностью из-за дисперсии в массе (объеме) также является одной из возможных причин сегрегационной

нестабильности плазмид. Отметим, что этот аспект нестабильности практически неконтролируем при длительном культивировании, т.к. даже изначально синхронизованная “одномерная” культура бактерий теряет свою синхронность за несколько поколений (Smith & Martin, 1973; Романовский и др. 1975).

Таким образом, механизм сегрегации плазмид при делении (точный, случайный и т.п.), эффективность (или точность) контроля копийности, скорость рекомбинации мутаций и распределение клеток по размерам являются основными причинами (известными нам к настоящему времени) сегрегационной нестабильности плазмид. Очевидно, что только последний фактор обеспечивает несимметричность стационарных распределений клеток с различным числом копий плазмиды, многократно отмеченная экспериментально (Bailey et al., 1983; Lobner-Olesen, 1999; Srienc et al., 1986; Tseng et al., 1997).

Г Л А В А 4 .

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНИРОВАННЫХ В ПЛАЗМИДЕ ГЕНОВ НА ПОПУЛЯЦИОННУЮ ДИНАМИКУ ПЛАЗМИД МИКРООРГАНИЗМОВ

В предыдущих главах мы рассмотрели влияние наличия нескольких копий плазмиды в бактериальной клетке на популяционную динамику плазмидсодержащих микроорганизмов и обнаружили, что во многих случаях учет *копийности* рекомбинантных плазмид приводит к новым результатам (как, например, распределение клеток с различным числом плазмид) и в ряде случаев помогает объяснить наблюдаемые эффекты (как например снижение селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании в хемостате). Одним из важных предположений в нашем анализе являлось влияние числа копий плазмиды на время генерации хозяйской клетки. И хотя такая зависимость скорости роста популяции бактерий от концентрации экстрохромосомальной ДНК (плазмидной ДНК) была действительно обнаружена в ряде экспериментов (Engberg et al., 1975; Nguyen et al., 1989; Smith & Bidochka, 1998; Zund & Lebek, 1980), однозначного соответствия между размером плазмиды (и ее копийностью) и метаболической нагрузкой на клетку-хозяина, которую эта плазида вызывает, к настоящему времени как известно автору предложено не было. Мы (как возможно и многие другие исследователи) полагаем, что не просто присутствие дополнительной плазмидной ДНК в бактериальной клетке ведет к снижению скорости роста популяции микроорганизмов, содержащих эту плазмиду, а скорее всего неконтролируемая экспрессия клонированных в плазмиде генов ответственна за такое снижение. Под экспрессией генов мы понимаем как гены, клонированные в плазмиде методами генной инженерии, так и гены ответственные за поддержание плазмиды в популяции микроорганизмов, т.е. вовлеченные в регуляцию копийности плазмид, активного распределения плазмид по дочерним клеткам при делении и т.п. В этой главе мы рассмотрим как эффективность экспрессии рекомбинантных генов, находящихся на плазмиде, влияет на стабильность плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов при их длительном культивировании в периодической и непрерывной культуре.

4.1. Метод оценки кинетических параметров штаммов микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды.

Достоинство математических моделей часто состоит не только в предсказании новых эффектов, но и в оценке параметров модели на основе экспериментальных данных и сравнении оцененных параметров при различных внешних условиях. К сожалению, хотя и к настоящему времени биология становится все более точной наукой и все больше экспериментов проводится с необходимой для многих современных моделей точностью, микробиология не относится к числу таких продвинутых областей естествознания. Многие эксперименты, в которых изучались (и изучаются) причины нестабильности плазмидсодержащих микроорганизмов, представляют в основном динамику фракции плазмиднесущих (бесплазмидных) клеток (Noack et al., 1981; Wouters et al., 1980), хотя исключения известны (Caulcott et al., 1985; Duetz and van Andel, 1991; Filonov et al., 1997). При этом экспрессия плазмидных генов и/или средняя копияность бактериальных клеток обычно не измеряется, как, например, в типичной работе (Noack et al., 1981), не говоря уже о распределении копияности в популяции микроорганизмов. Учитывая этот факт, мы нашли излишним применение разработанной нами распределенной модели для нахождения параметров плазмидсодержащих клеток (мы смогли бы описать практически любые из этих данных при достаточно простых биологических предположениях), и, где не обозначено противоположное, применили модель, разработанную Левиным и Стюартом (далее модель ЛС) для описания динамики плазмид в популяции микроорганизмов (Stewart and Levin, 1977) и ранее Мозером для описания динамики мутантов в хемостате (Moser, 1958). Хотя эта модель и является достаточно общей, она не отражает некоторые наблюдаемые эффекты как, например, изменение среднего числа копий плазмиды на клетку (рис. 3.1.7), но тем не менее может быть применена в подавляющей большинстве случаев, где такие изменения не наблюдаемы либо не измеряны. В этой части мы разработаем метод оценки основных параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов, основанный на модели ЛС, а именно селективное преимущество бесплазмидных клеток α (или селективный коэффициент, что обозначено s работах Фишера и его последователей (Fisher, 1930)) и коэффициент τ_0 , описывающий скорость образования бесплазмидных клеток⁸, который в дальнейшем мы будем называть просто вероятностью образования

⁸ Более точно $\tau_0 \approx \theta/2$, где θ - вероятность образования бесплазмидной клетки при делении (см. далее).

бесплазмидной клетки (этот параметр совпадает с переменной τ_0 , приведенной в основной модели (3.1.1)). Как следующий шаг мы применим разработанный метод для понимания причин нестабильности плазмид при различных условиях культивирования в ряде экспериментов, а также кратко сравним разработанный нами метод оценки параметров плазмиднесущих микроорганизмов с ранее предложенными (Boe et al., 1987; Boe and Rasmussen, 1996; Caulcott, 1984; Caulcott et al., 1985; Cooper et al., 1987; Davidson et al., 1990; Duetz and van Andel, 1991; Duetz et al., 1991; Dunn et al., 1995; Filonov et al., 1997; Godwin and Slater, 1979; Impoolsup et al., 1989; Lenski and Bouma, 1987; Proctor, 1994; Tolker-Nielsen and Boe, 1994; Walmsley et al., 1983).

Оценка параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов. Одним из методов, который может быть применен для понимания причин нестабильности рекомбинантных плазмид в различных условиях культивирования, является разработка математической модели, которая достаточно точно описывает экспериментальные данные и с помощью которой параметры, определяющие нестабильность плазмидсодержащих штаммов могут быть оценены. В некоторых случаях математическая модель ЛС является хорошим первым приближением динамики плазмид в непрерывной и периодической культуре (модель, разработанную в главе 3 можно считать вторым приближением).

В общем случае, математическая модель ЛС (1.2.1) описывает динамику сегрегационно и кинетически конъюгативных плазмид, однако большинство рекомбинантных плазмид являются неконъюгативными (гены, обеспечивающие конъюгативный перенос плазмид, занимают достаточно большой объем на плазмиде, и часто не включаются в состав малоразмерных векторов, как, например, pBR322). Учитывая этот факт, мы перепишем модель (1.2.1):

$$\begin{cases} \frac{dX^+(t)}{dt} = [\mu^+(S) - D] \cdot X^+(t) - \tau_0 \mu^+(S) X^+(t), \\ \frac{dX^-(t)}{dt} = [\mu^-(S) - D] \cdot X^-(t) + \tau_0 \mu^+(S) X^+(t), \\ \frac{dS(t)}{dt} = D[S_0 - S(t)] - \frac{\mu^+(S)X^+(t)}{y^+} - \frac{\mu^-(S)X^-(t)}{y^-}, \end{cases} \quad (4.1.1)$$

где обозначенные параметры описаны в подписи к выражению (1.2.1). Отметим, что в данных обозначениях, время t обозначает хронологическое время, тогда как число генераций, прошедших с начала культивирования плазмидсодержащих клеток в хемостате,

определяется как $g = t/t_g = tD/\ln(2)$, где $t_g = \ln(2)/D$ - время генерации в хемостате (Dykhuizen and Hartl, 1983).

И хотя в общем случае система (4.1.1) содержит 7 неизвестных параметров, только два из них являются наиболее важными и относящимися только к плазмидсодержащему штамму и характеризующие соответственно кинетическую и сегрегационную нестабильность плазмид: селективное преимущество бесплазмидных клеток (или стоимость плазмиды, α , выражение 1.2.2) и вероятность потери плазмиды при делении τ_0 . Мы предлагаем использовать эти характеристики плазмиднесущих клеток как стандартные параметры штаммов, как, например, максимальная скорость роста μ_{\max} и константа полунасыщения по субстрату K_S являются стандартными характеристиками бактерий при заданных условиях культивирования (Dykhuizen and Hartl, 1983; Monod, 1949; Pirt, 1975). Однако необходимо отметить, что ряд других параметров был использован для характеристики нестабильности плазмид, как, например, отношение скоростей роста (или времен генерации) $C = \mu^- / \mu^+$, разница скоростей роста $m = \mu^- - \mu^+$ и скорость потери плазмид $R = \tau_0 \mu^+$. Мы предпочитаем использовать параметры α и τ_0 по двум основным причинам: во-первых, эти параметры являются безразмерными, а следовательно могут быть легко сравнены, и во-вторых, они имеют простой биологический смысл – стоимость плазмиды и вероятность потери плазмиды при делении.

Математическая модель (4.1.1) не имеет точного аналитического решения, хотя и качественный анализ этой модели был проведен достаточно подробно (Hsu *et al.*, 1995; Lenski & Hattingh, 1986; Lu & Haderler, 1998; Smith & Waltman, 1995; Апонин и др., 1984, Апонин и Апонина, 1996). Численный анализ показывает, что динамика плазмидсодержащих клеток состоит из четырех последовательных фаз (Ganusov and Brilkov, 2001).

1. В течение начальной фазы популяция плазмидсодержащих клеток увеличивается в плотности до стационарного значения $X^+ = y^+(S_0 - \tilde{S})$ (см. рис. 4.1.1). Причина такой пролиферации заключается в том, что изначальный инокулята обычно приготавливается в достаточно маленьком объеме $\sim 5-10$ мл (при плотностях $\sim 10^9$ клеток/мл) и разводится в хемостате, объем которых обычно 100-1000 мл. Экспоненциальное увеличение численности плазмидной популяции может привести к появлению существенной фракции бесплазмидных клеток и соответственно повлиять на последующую динамику замещение плазмидсодержащего штамма на бесплазмидный вариант. Этот процесс может быть пре-

дотворщен, если в среду добавлен антибиотик (до установления стационарного состояния по численности) либо если используется среда, в которой рост бесплазмидных клеток невозможен.

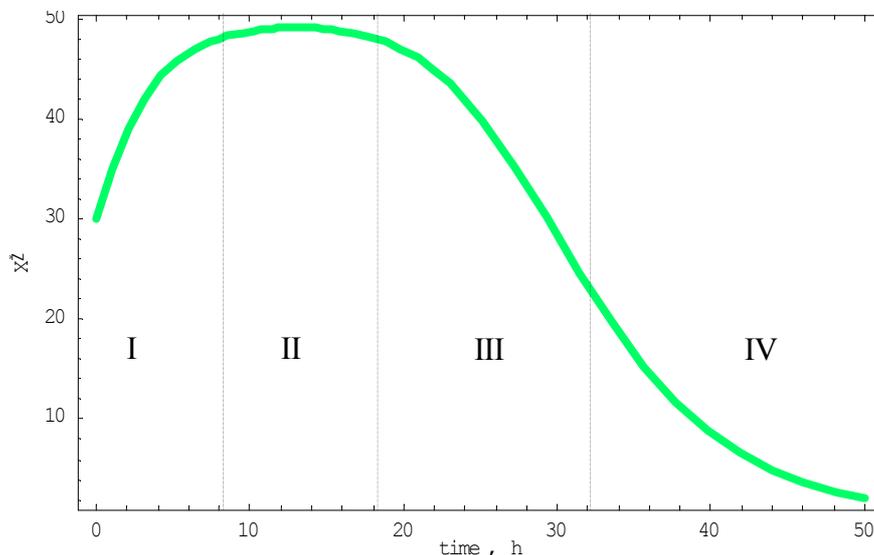


Рис. 4.1.1. Динамика полного числа клеток в хемостате. Начальное число клеток выбрано ниже стационарного, $X^+ = 30$ (остальные параметры такие же, как и в подписи к рис. 4.1.2, сплошные линии). I, II, III и IV – фазы динамики плазмидсодержащих клеток.

2. После начального увеличения плотности плазмиднесущей популяции, в хемостате наблюдается квази-стационарное состояние, когда число плазмидных клеток и концентрация субстрата практически не меняются (рис.4.1.1 и 4.1.2) и могут быть определены из системы 4.1.1:

$$\mu^+(\tilde{S}) \approx D, \quad \tilde{X}^+ = y^+(S_0 - \tilde{S}). \quad (4.1.2)$$

В течение этой фазы число плазмиднесущих клеток значительно превосходит число бесплазмидных ($X^+ \gg X^-$) и, следовательно, время генерации плазмидсодержащей популяции соответствует времени генерации в хемостате.

3. Следующая фаза – фаза замещения плазмидного штамма на бесплазмидный вариант.

4. Окончательно, когда число бесплазмидных клеток сравнивается (и превосходит) с числом плазмидных, в хемостате наблюдается второе квази-стационарное состояние, где время генерации бесплазмидной популяции теперь определяется временем генерации в

хемостате:

$$\mu^-(\tilde{S}) \approx D, \quad \tilde{X}^- = y^-(S_0 - \tilde{S}). \quad (4.1.3)$$

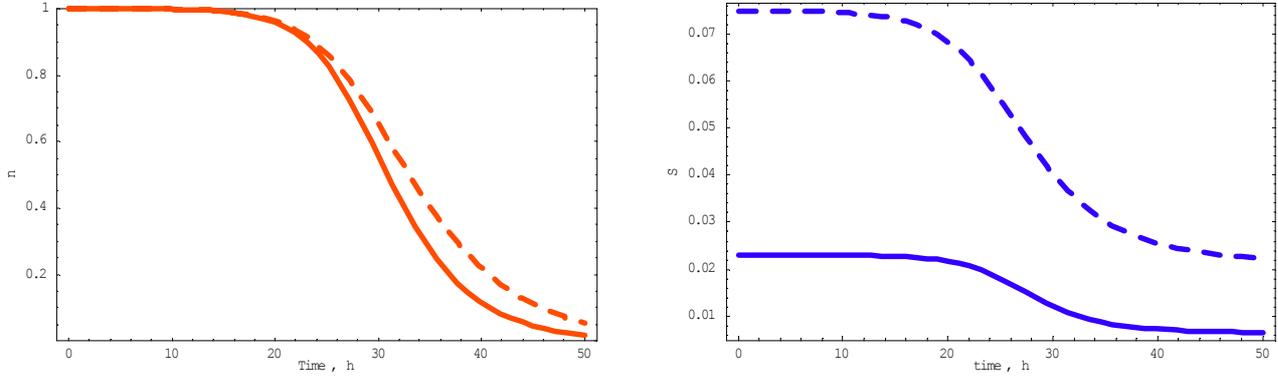


Рис. 4.1.2. Динамика фракции плазмиднесущих клеток (слева) и концентрации лимитирующего рост субстрата (справа) в хемостате в соответствии с численным решением системы 4.1.1. Параметры: $D = 0.3 \text{ час}^{-1}$, $S_0 = 100$, $y^+ = y^- = 0.5$, $\tau_0 = 10^{-4}$, начальная плотность плазмидсодержащих клеток и концентрация субстрата взяты в стационарном состоянии (см. выражение 4.1.2). Штриховые линии – константы полунасыщения одинаковы для плазмидного и бесплазмидного штаммов: $K_S^- = K_S^+ = 0.05$, $\mu_{\max}^- = 1 \text{ час}^{-1}$, $\mu_{\max}^+ = 0.5 \text{ час}^{-1}$ (т.е. $\alpha = 0.5$). Сплошные линии – константы полунасыщения не одинаковы для плазмидного и бесплазмидного штаммов: $K_S^+ = 0.05$, $K_S^- = 0.015$, $\mu_{\max}^- = 1 \text{ час}^{-1}$, $\mu_{\max}^+ = 0.95 \text{ час}^{-1}$ (т.е. $\alpha^+ \approx 0.51$ и $\alpha^- \approx 0.64$).

Следовательно, при оценке параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов две особенности их динамики в хемостате должны быть учтены: 1) изменение времени генерации (плазмидные \rightarrow бесплазмидные) и 2) изменение концентрации субстрата при замещении плазмидного штамма бесплазмидным вариантом. Последнее качество особенно важно, так как в общем случае селективный коэффициент, определенный в (1.2.2) зависит от концентрации субстрата в среде (исключая тот редкий случай равных констант полунасыщения для плазмидных и бесплазмидных клеток, тем не менее наблюдаемый для некоторых плазмид, (Wouters and van Andel, 1983)), а следовательно может изменяться при замещении плазмидной популяции бесплазмидным вариантом. Этот факт игнорировался в большинстве методов, разработанных для оценки плазмидных параметров, хотя равенство констант полунасыщения обычно неизвестно *a priori* и должно быть проверено в каждом отдельном случае. Мы, таким образом, предложим простой метод, который позволит оценить селективный коэффициент в начале α^+ и в конце α^- культи-

вирования, а также вероятность потери плазмиды при делении. Для случая, когда константы полунасыщения могут быть предположены равными или, что идентично, $\alpha^+ = \alpha^-$ мы получим аналитическое приближение модели (4.1.1), позволяющее с большой достоверностью оценить параметры плазмидсодержащих клеток.

Общий случай $K_S^- \neq K_S^+$. Наш метод основан на использовании приближений квазистационарного роста, наблюдаемого в начале и в конце культивирования (выражения 4.1.2 - 4.1.3). Более точно, мы предположим, что хотя параметры модели зависят от концентрации субстрата, в стационарном состоянии они все приблизительно являются константами. В дальнейшем мы будем использовать две удобные характеристики:

$$\begin{aligned} z &= \frac{X^-}{X^+}, \\ n &= \frac{X^+}{X^- + X^+} = \frac{1}{1+z}, \end{aligned} \quad (4.1.4)$$

где z - отношение числа бесплазмидных клеток в популяции к числу плазмидсодержащих и n - доля плазмидсодержащих клеток в популяции микроорганизмов. С учетом этих определений первые два уравнения системы (4.1.1) могут быть переписаны в виде:

$$\frac{dz}{dt} = \mu^+(S) \left[\frac{\alpha(S)}{1-\alpha(S)} z + \tau_0(1+z) \right], \quad (4.1.5)$$

$$\frac{dz}{dt} = \mu^-(S) [\alpha(S)z + \tau_0(1+\alpha(S))(1+z)]. \quad (4.1.6)$$

Заметим, что оба уравнения являются точными, если динамика субстрата также принята во внимание, так как в общем случае селективный коэффициент зависит от концентрации субстрата. Отметим, что подобные уравнения (только для переменной n) были получены в ряде предшествующих работ (Caulcott et al., 1987; Cooper et al., 1987; Dunn et al., 1995; Proctor, 1994).

Оценка селективного коэффициента α^- . Селективный коэффициент плазмиднесущих клеток в конце культивирования может быть оценен, если мы предположим квазистационарное состояние, удовлетворяющее условию (4.1.3). Тогда при $\mu^-(\tilde{S}) \approx D$ уравнение (4.1.6) переписывается в виде:

$$\frac{dz}{dt} \approx \alpha^- Dz + \tau_0 (1 - \alpha^-)(1 + z), \quad (4.1.7)$$

где его решение находится прямым интегрированием:

$$z(g) = z_0 2^{[\tau_0(1-\alpha^-)+\alpha^-]g} + \frac{\tau_0}{\tau_0 + \alpha^-/(1-\alpha^-)} \left(2^{[\tau_0(1-\alpha^-)+\alpha^-]g} - 1 \right). \quad (4.1.8)$$

где $g = \ln 2/D$ - время генерации в хемостате. Так как мы предполагаем, что $z \gg 1$, мы можем пренебречь вторым членом в выражении (4.1.8), и таким образом, мы находим оценку для α^- (при $\tau_0 \ll 1$)

$$\ln z(g) \approx \ln C + \alpha^- g \ln 2. \quad (4.1.9)$$

(заметим, что так как на самом деле мы оцениваем параметр $\alpha^- + \tau_0(1 - \alpha^-)$, аппроксимация (4.1.9) обеспечивает максимальную оценку селективного коэффициента).

Подобное выражение было предложено ранее для оценки селективного преимущества и вероятности потери плазмиды (последнее неверно по ряду причин) в ряде работ (Cooper et al., 1987; Печуркин и др., 1990; Брильков и др., 1990), а также для оценки разницы в скоростях роста исходного и мутантного штаммов при культивировании в хемостате (Dykhuizen and Hartl, 1983; Moser, 1958). Таким образом, аппроксимируя экспонентой отношение бесплазмидных клеток к плазмидсодержащим (при $z \gg 1$) мы с легкостью можем оценить селективное преимущество бесплазмидных клеток α^- , которое пропорционально тангенсу угла наклона кривой z (в логарифмических координатах). Аналогичный результат для хемостатного культивирования был также найден в работах (Caulcott et al., 1987; Cooper et al., 1987; Proctor, 1994) и для периодического культивирования (Вое, 1996; Вое and Rasmussen, 1996). Отметим, что использование пересечения кривой (4.1.9) с осью ординат для оценки параметра C не может быть использовано для оценки вероятности потери плазмиды τ_0 как это было применено в работах (Брильков и др., 1990; Caulcott et al., 1985; Cooper et al., 1987), так как приближение стационарного роста (фаза IV), предположенное для вывода выражения (4.1.9) является точным только при большой численности бесплазмидных клеток (экстраполяция $z < 1$ не входит в это приближение). В дополнение,

кажется нелогичным оценивать вероятность потери плазмиды, когда численности плазмиднесущих и бесплазмидных клеток одинаковы и основным процессом, вовлеченным в изменение доли бесплазмидных клеток в популяции, является конкуренция клеток за субстрат (характеризуемая коэффициентом α^-).

Оценка селективного коэффициента α^+ и вероятности потери плазмиды τ_0 .

Аналогично предыдущему примеру мы рассмотрим квази-стационарное состояние в хемостате, когда большинство клеток являются плазмидсодержащими, т.е. $z \ll 1$. Предполагая $\mu^+(S) \approx D$ и, следовательно, уравнение (4.1.6) может быть решено простым интегрированием:

$$z(g) = z_0 2^{\lceil \tau_0 + \alpha^+ / (1 - \alpha^+) \rceil g} + \frac{\tau_0}{\tau_0 + \alpha^+ / (1 - \alpha^+)} \left(2^{\lceil \tau_0 + \alpha^+ / (1 - \alpha^+) \rceil g} - 1 \right), \quad (4.1.10)$$

где мы заметим, что это уравнение отличается от выражения (4.1.9), полученного для α^- . Очевидно, что если начальная концентрация бесплазмидных клеток не является нулевой ($z_0 > 0$), параметр τ_0 не может быть определен с большой точностью (если $\tau_0 < \alpha^+$, что верно для большинства бактериальных рекомбинантных плазмид, (Duetz et al., 1991)). Интуитивный аргумент для этого аналогичен предыдущему: при ненулевой начальной концентрации бесплазмидных клеток и достаточно большом селективном коэффициенте увеличение численности бесплазмидной популяции будет происходить за счет экспоненциального роста (конкуренции), а не за счет потери плазмид плазмидсодержащими клетками. Следовательно, для оценки стоимости плазмиды и вероятности потери плазмиды мы предположим, что начальная концентрация бесплазмидных клеток является малой ($z_0 \approx 0$); тогда логарифмируя выражение (4.1.10) мы находим:

$$\ln z(g) \approx \ln \frac{\tau_0 (1 - \alpha^+)}{\tau_0 (1 - \alpha^+) + \alpha^+} + \ln \left(2^{\lceil \tau_0 + \alpha^+ / (1 - \alpha^+) \rceil g} - 1 \right). \quad (4.1.11)$$

Отметим, что в общем случае параметры α^+ и τ_0 не могут быть определены из простой линейной регрессии, а, следовательно, для их оценки нелинейная регрессия должна быть использована. Однако, если можно предположить независимость селективного ко-

эфициента от концентрации субстрата в среде ($\alpha^+ = \alpha^- = \alpha$) и если вероятность потери плазмиды значительно меньше стоимости плазмиды, τ_0 может быть найдено, используя простую линейную регрессию:

$$\ln z(g) \approx \ln \tau_0 + \ln \frac{(1-\alpha)}{\alpha} + \ln(2^{\alpha/(1-\alpha)g} - 1), \quad (4.1.12)$$

где селективное преимущество $\alpha = \alpha^-$ определено в (4.1.9). Из уравнения (4.1.12) мы также можем предложить вторую важную характеристику T_0 (в дополнение к времени полуэлиминации плазмид $T_{1/2}$, определенного в главе 3) - время, когда малое число бесплазмидных клеток z ($z \ll 1$) появится в изначально гомогенной популяции плазмидсодержащего штамма:

$$T_0 \approx \frac{1}{\ln 2} \frac{(1-\alpha)}{\alpha} \ln \left(\frac{z \cdot \alpha}{\tau_0 (1-\alpha)} \right), \quad (4.1.13)$$

где T_0 дано в генерациях плазмиднесущего варианта. Рис. 4.1.3 представляет основные свойства времени T_0 при изменении параметров α и τ_0 в диапазоне наиболее правдоподобных биологических значений.

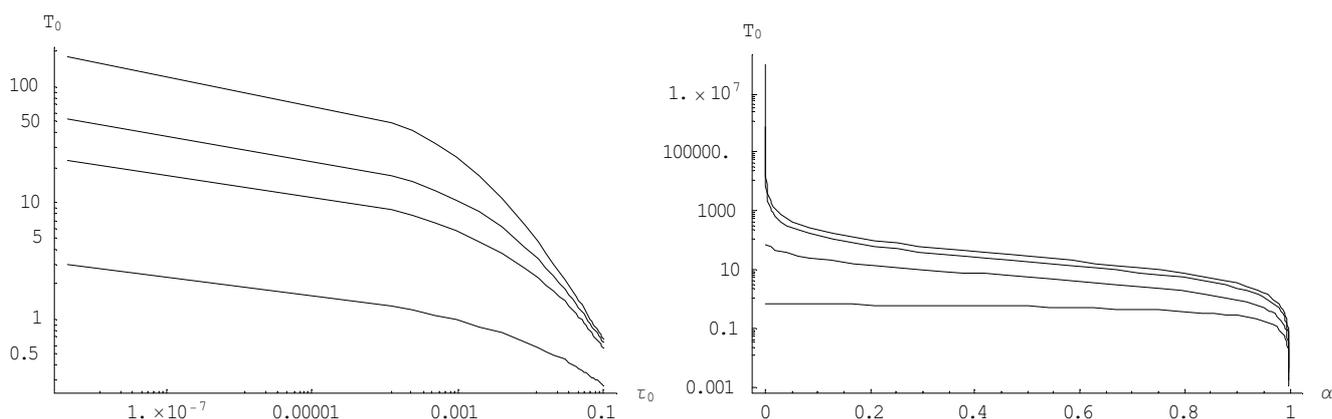


Рис. 4.1.3. Время появления малого числа $z = 5\%$ бесплазмидных клеток при культивировании изначально гомогенного плазмидсодержащего штамма в хемостате в соответствии с выражением (4.1.13). Левый график (сверху вниз): $\alpha = 0.1, 0.3, 0.5, 0.9$. Правый график (снизу вверх): $\tau_0 = 0.1, 10^{-3}, 10^{-7}, 10^{-10}$.

Два интересных наблюдения следуют из анализа рис. 4.1.3. Во-первых, время ста-

бильного поддержания плазмид (T_0) возрастает экспоненциально с уменьшением вероятности образования бесплазмидной клетки τ_0 (по крайней мере при $\tau_0 < 10^{-4}$, что верно для многих природных плазмид (Вое, 1996)), более того, эта скорость возрастания практически не зависит от селективного коэффициента (в первом приближении). С другой стороны, при достаточно больших α скорость элиминации плазмидсодержащего штамма возрастает многократно. Например, $T_0(\alpha = 0.1) \approx 200$ генераций, тогда как $T_0(\alpha = 0.9) \approx 4$ генерации (при $\tau_0 \sim 10^{-7}$).

Во-вторых, при $\alpha > 0.5$ плазмиднесущие бактерии не поддерживаются в хемостате даже при исчезающе малых $\tau_0 \approx 10^{-10}$. Более того, разница между временем поддержания штаммов с разными τ_0 становится неразличимой при высоких селективных коэффициентах, что означает, что элиминация плазмидсодержащих клеток осуществляется в основном благодаря конкуренции с бесплазмидным вариантом. Когда же селективный коэффициент является бесконечно малым $\alpha \approx 0$, что возможно либо при малой копияности плазмиды, либо при невысокой экспрессии плазмидных генов, плазмиды могут поддерживаться виртуально долго, так как время T_0 достигает бесконечно больших значений (это утверждение также верно, если ограничение $\tau_0 \ll \alpha$ не выполняется, Ганусов и др., 2000).

Зная время T_0 и число бесплазмидных клеток к этому времени z , мы можем с легкостью оценить вероятность образования бесплазмидной клетки τ_0 из нелинейного уравнения (4.1.11) при известном $\alpha^+ = \alpha^-$, аналогичное выражению (4.1.12)⁹:

$$\tau_0 \approx \frac{\alpha \cdot z}{(1 - \alpha)} 2^{-\alpha/(1-\alpha)T_0}. \quad (4.1.14)$$

Подобное выражение может также быть найдено при культивировании бактерий в серии пассажей в периодической культуре (Ganusov and Brilkov, 2001; не показано):

$$\tau_0 \approx \frac{\alpha \cdot z}{(1 - \alpha)} d^{-\alpha/(1-\alpha)N}, \quad (4.1.15)$$

где d - фактор разбавления (обычно $d \approx 10^{-3} - 10^{-4}$) и N - число последовательных пассажей, при которых число бесплазмидных клеток равняется z (для описания “конкурентного” эксперимента см. (Levin et al., 2000)). Выражение (4.1.15) является очень удобным для оценки параметра плазмиднесущих бактерий τ_0 в экспериментах, проведенных в периодической культуре (Б. Левин, персональное сообщение). Например, при $\alpha = 0.1$, $d \approx 2 \cdot 10^{-3}$ (разведение 1:500), $z = 1\%$ и $N = 10$ (длительность эксперимента = 10 дней) мы находим вероятность потери плазмиды $\tau_0 \approx 1.1 \cdot 10^{-6}$.

Рис. 4.1.4. Вероятность образования бесплазмидной клетки при появлении $z = 10\%$ бесплазмидных клеток при культивировании плазмидсодержащего штамма в периодике в соответствии с предложенным в данной работе (4.1.15) и Бое (Boe and Rasmussen, 1996) оценками. Непрерывная линия - (Boe and Rasmussen, 1996), штриховая (маленькие штрихи) - наше приближение (4.1.15), широкие штрихи - использование приближений . . . и

Подобный метод нахождения параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов в периодической культуре был также предпринят в одной из недавних работ (Boe, 1996; Boe and Rasmussen, 1996). Авторы разработали дискретную модель пролиферации плазмидсодержащих клеток в периодической культуре для случая, когда времена генерации плазмидных и бесплазмидных суб-популяций не являются равными (или в наших обозначениях . . .). Несмотря на то, что результат Бое был получен для дискретного роста бактерий в периодической культуре, мы получили приближенно эквива-

⁹ Эта оценка является максимальной.

лентные оценки для параметров μ и λ , что изображено на рис. 4.1.4. Отметим, что Voe and Rasmussen (1996) оценивали параметры μ (вероятность образования бесплазмидной клетки при делении плазмидсодержащей) и λ (отношение времен генерации плазмиднесущего и бесплазмидного штаммов), которые, очевидно, имеют прямое соответствие с параметрами, оцениваемыми нашими методами.

Частный случай $\mu = \lambda$. Подробный анализ ряда экспериментальных данных, проведенный в данной работе (см. далее) и ряде других (Caulcott et al., 1987; Duetz and van Anandel, 1991; Dunn et al., 1995; Godwin and Slater, 1979; Брильков и др., 1990) показывает, что селективное преимущество бесплазмидных клеток часто зависит от удельной скорости разбавления среды в хемостате, а, следовательно, от концентрации лимитирующего рост субстрата. Однако можно предположить, что при культивировании в хемостате плазмидсодержащих бактерий с определенной скоростью протока среды D , селективный коэффициент не изменяется значительно при замещении плазмидной популяции бесплазмидным вариантом. Тогда можно предположить, что $\mu = \lambda = \text{const}$. При постоянном селективном коэффициенте уравнение (4.1.5) (или (4.1.6)) может быть решено аналитически. Так как уравнение (4.1.5) содержит неизвестную функцию $n^*(s)$, наиболее широко применяется приближение $n^*(s) = n_0$ для нахождения его аналитического решения (Cooper et al., 1987; Davidson et al., 1990; Dunn et al., 1995; Lenski and Bouma, 1987; Proctor, 1994), которое может быть выражено через долю плазмидсодержащих клеток в хемостате n :

$$\frac{dn}{dt} = \mu n - D n, \quad (4.1.16)$$

где $\mu = \lambda$ и $n_0 = \mu / D$. Оценка параметров выражения (4.1.16) проводится методами нелинейной регрессии (Davidson et al., 1990; Dunn et al., 1995; Proctor, 1994). Основным недостатком решения (4.1.16) является факт, что оно не учитывает изменение времени генерации в хемостате от плазмиднесущих клеток к бесплазмидным клеткам (см. выше), которое строго говоря значительно при $\mu \ll D$. Если же селективный коэффициент мал $\mu \ll D$, то оценка параметров в соответствии с выражением (4.1.16) достаточно точна (Dunn et al., 1995).

Мы тем не менее предлагаем альтернативный и более элегантный способ оценки μ и

ρ_0 , который учитывает изменение времени генерации в хемостате и был ранее предложен Дуетзом и ван Анделом для оценки селективного коэффициента при $\rho_0 = 0$. (Duetz and van Andel, 1991). Для этого мы заметим, что после начальной фазы пролиферации плазмиднесущих клеток (фаза I на рис. 4.1.1), фракция плазмидной популяции n подчиняется уравнению:

$$\dot{n} = n(\rho_0 - \rho_0 n) \quad (4.1.17)$$

Тогда выражая скорость роста бесплазмидных клеток из уравнения (4.1.17) мы находим уравнение на динамику доли бесплазмидного варианта в популяции микроорганизмов p :

$$\dot{p} = p(\rho_0 - \rho_0 p) - \frac{p}{\rho_0} \quad (4.1.18)$$

которое при $\rho_0 = 0$ совпадает с ранее предложенным (Duetz and van Andel, 1991). Решение уравнения (4.1.18) находится прямым интегрированием:

$$\int \frac{dp}{p(\rho_0 - \rho_0 p) - \frac{p}{\rho_0}} = \int dt \quad (4.1.19)$$

Как и в предыдущем случае, для оценки параметров плазмиднесущих клеток необходимо использовать нелинейную регрессию. Отметим, что в решении (4.1.19) искомая функция $p(t)$ задана неявно.

Ограничения и преимущества методов оценки параметров. Как было упомянуто выше, все ранее предложенные методы оценки параметров плазмидных клеток можно условно разделить на 2 группы:

- Использующие линейные аппроксимации исходной модели (4.1.5)-(4.1.6) или решения (4.1.16) (Boe et al., 1987; Boe and Rasmussen, 1996; Caulcott et al., 1985; Cooper et al., 1987; Duetz et al., 1991; Dunn et al., 1995; Impoolsup et al., 1989; Lenski and Bouma, 1987; Proctor, 1994; Tolker-Nielsen and Boe, 1994; Walmsley et al., 1983;

Брильков и др., 1990). Основным недостатком этих методов является применение линейной регрессии для оценки вероятности потери плазмиды p_0 при значительной концентрации бесплазмидных клеток, что приводит к значительной погрешности в оцененном значении (не показано).

- Использующие приближенное решение (4.1.16). Здесь ошибка в оценке возрастает многократно для плазмид с большой стоимостью, так как факт смены времени генерации в хемостате: со времени генерации плазмидсодержащих клеток (начало культивирования) к времени генерации бесплазмидных клеток (конец культивирования) не учитывается (Davidson et al., 1990; Dunn et al., 1995; Lenski and Bouma, 1987; Proctor, 1994; Walmsley et al., 1983).

Применение методов к симулированным данным. Для более убедительной демонстрации недостатков метода нелинейной регрессии (4.1.16), который считается наиболее точным к настоящему времени (см. дискуссию в (Dunn et al., 1995; Proctor, 1994)) мы генерировали 2 набора данных из численного решения модели (4.1.1) при двух приближениях $k_s^- - k_s^+$ и $k_s^- \cdot k_s^+$. Параметры, использованные для симулированных данных идентичны параметрам, приведенным в подписи к рис. 4.1.2. Мы использовали 3 основных метода оценки параметров: 1 – метод нелинейной регрессии в соответствии с решением (4.1.16); 2- метод нелинейной регрессии в соответствии с решением (4.1.19); 3 – линейное приближение (4.1.11) для оценки k_s^- и p_0 и 3а – линейное приближение (4.1.9) и (4.1.12) для оценки k_s^- и p_0 (предполагая $k_s^- \cdot k_s^+$). Для линейной и нелинейной регрессии мы использовали программу “Математика” (Wolfram, 1990). Результаты анализа приведены в Таблице 4.1.1.

Случай $k_s^- - k_s^+$ или $k_s^- \cdot k_s^+$. Очевидно, что все три метода, предложенные в данной работе достаточно четко определяют селективный коэффициент и вероятность потери плазмиды, если селективный коэффициент не зависит от концентрации субстрата в среде. Напротив, метод нелинейной регрессии, использованный рядом других исследователей (Davidson et al., 1990; Dunn and North, 1991; Lenski and Bouma, 1987), дает заниженную оценку для селективного коэффициента и завышенную для вероятности потери плазмиды. Это связано с неучитыванием смены времени генерации в хемостате при замещении плазмидного штамма на бесплазмидный вариант (как обсуждалось выше). Однако для малых k_s^- метод 1 дает достаточно близкое к истинному значение.

Табл. 4.1.1. Оценка параметров плазмиднесущего штамма для двух наборов данных, генерированных из численного решения основной математической модели (4.1.1). Параметры, использованные для генерации данных, аналогичны приведенным в подписи к рисунку (4.1.2): $k_s^- = k_s^+ = 10^{-4}$ и $\tau_0 = 10^{-4}$, для $k_s^- = k_s^+ = 10^{-4}$, $\tau_0 = 10^{-4}$ (остальные параметры см. рис. 4.1.2). Описание методов дано в основном тексте.

Нелинейный метод 2, использующий точное решение модели (4.1.1) при $\tau_0 = 10^{-4}$, обеспечивает наиболее точную оценку как для селективного коэффициента, так и для вероятности потери плазмиды (табл. 4.1.1), как по средним значениям, так и стандартным отклонениям.

Оценка параметров методами 3 и 3а, использующими только часть экспериментальных данных (начальные 5 и конечные 4 точки) также дает достаточно близкие значения при $\tau_0 = 10^{-4}$. Однако, этот результат не следует переоценивать, так как основная проблема таких методов (так и для методов, разработанных в (Cooper et al., 1987)) заключается, в том, что число точек, используемых для регрессии должно быть определено экспериментатором, и соответственно, предвзято. Более того, такие методы обычно обладают большой погрешностью в определении параметров в сравнении с нелинейными методами, использующих все экспериментальные точки (см. далее).

Случай $k_s^- = k_s^+ = 10^{-4}$ или $\tau_0 = 10^{-4}$. Этот случай демонстрирует несостоятельность большинства методов обеспечить достаточно точные оценки для селективного коэффициента и вероятности потери плазмиды при делении (см. Табл. 4.1.1). Простейшее объяснение этому феномену является то, что методы 1 и 2 получены в приближении $\tau_0 = 10^{-4}$, которое не верно для генерированных данных. Интересно отметить, что метод 2 дает оценку селективного коэффициента, которая приблизительно является средней между известными k_s^- и k_s^+ . Единственный метод, с помощью которого наиболее точные оценки параметров k_s^- , k_s^+ и τ_0 были получены, оказался метод 3; однако полученные значения были чувствительны к числу точек, использованных для регрессии (включено в стандартное отклонение).

Заключение. Мы считаем, что эти результаты показывают, что оценка параметров

плазмидсодержащих штаммов, растущих в хемостате при контролируемых (по сравнению, например, с периодикой) условиях, является не такой уж простой задачей, как считалось ранее (Boe and Rasmussen, 1996). Во-первых, *a priori* не известно зависит ли селективный коэффициент от концентрации субстрата или нет (зависимость от скорости потока среды в хемостате была определена для ряда плазмидных штаммов, (Caulcott et al., 1985; Duetz and van Anandel, 1991; Godwin and Slater, 1979)). И во-вторых, применение методов, использующих только частичные данные, часто также является переменной и может значительно изменить результирующие оценки. Наша рекомендация тем не менее заключается в начальном применении метода 3 (регрессия начальных и конечных точек), дающего оценку на μ , μ_{max} и μ_{crit} , а затем, если селективный коэффициент статистически одинаков в начале и конце культивирования, более точная оценка может быть получена с использованием метода 2. Отметим также, что для точной оценки методом 3 число точек в начале (при μ_{crit}) и в конце (при μ_{max}) культивирования должно быть значительным, иначе стандартная ошибка в оцененных значениях является большой (см. далее).

Применение методов оценки параметров к экспериментальным данным. Генно-инженерные штаммы микроорганизмов, содержащие рекомбинантные плазмиды, часто оказываются нестабильными при длительном культивировании в непрерывной культуре (Боронин и др. 1985; Печуркин и др., 1990; Попова и др., 1992; Wouters & van Anandel, 1979). В большинстве случаев, изменение условий культивирования, как например удельной скорости разбавления среды в хемостате D , температуры, лимитирующего рост фактора и т.п., существенно влияет на длительность поддержания плазмидсодержащих клеток как в хемостате, так и в турбидостате (Попова и др., 1992; Грицюк и др., 1999; Duetz & van Anandel, 1991; Duetz et al., 1991; Wouters et al., 1980, более подробно см. Печуркин и др., 1990). Например, еще с 80-х годов известен парадоксальный эффект, что при низких скоростях протока среды в хемостате плазмидные штаммы поддерживаются в культуре всего несколько генераций, тогда как при высоких скоростях протока даже после нескольких десятков генераций бесплазмидные клетки не наблюдаемы в популяции бактерий (Brownlie et al., 1990; Kleinman et al., 1986; Noack et al., 1981; Wouters et al., 1980). Причины такого значительного изменения в стабильности плазмид не были определены - это может быть вызвано изменением разницы в скоростях роста плазмидных и бесплазмидных клеток (селективный коэффициент), изменением в вероятности образования бесплазмидной клетки или обоих параметров. Здесь количественные методы математического моделирования могут быть применены к анализу экспериментальных данных (Caulcott,

1984; Caulcott et al., 1985; Cooper et al., 1987; Duetz and van Andel, 1991; Dunn et al., 1995; Godwin and Slater, 1979; Lenski and Bouma, 1987), где простейшая оценка параметров может показать, какой из параметров изменился при изменении внешних условий и следовательно, ответить на вопрос: почему это происходит (по крайней мере в первом приближении). В частности, в ряде экспериментов было обнаружено, что нестабильность некоторых рекомбинантных (pWW0) и природных (TP120) плазмид обусловлена снижением скорости роста плазмидсодержащих клеток при низких скоростях протока среды в хемостате (Duetz and van Andel, 1991; Godwin and Slater, 1979). Связь между условиями культивирования и вероятностью потери плазмид при делении в одних случаях не была обнаружена (Dunn et al., 1995), тогда как в других была предложена негативная корреляция между вероятностью потери плазмиды и скоростью роста популяции (Imrpoolsup et al., 1989). Однако, не очевидно, что i) эти выводы могут быть применены для любых плазмид и ii) выводы являются корректными, так как методы, использованные для оценки параметров (например в (Imrpoolsup et al., 1989)), обладают рядом недостатков, подробно обсужденных выше. Таким образом, для более качественного анализа мы применили разработанные в данной работе методы оценки параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов для двух опубликованных наборов данных.

Культивирование плазмидсодержащего рекомбинантного штамма на разных субстратах. Первый пример, который мы рассмотрим, основан на эксперименте, проведенном в лаборатории УБГ при Институте Биофизики СО РАН (Попова и др., 1992), основные данные из которого изображены на рис. 4.1.5.

Эксперимент был проведен в достаточно стандартных условиях. Ночная инокулятная культура, выросшая в периодической среде с антибиотиком, помещалась в хемостат, установленный на фиксированную удельную скорость разбавления $D=0.1 \text{ час}^{-1}$ (равной удельной скорости роста популяции микроорганизмов в стационарном состоянии) со средой лимитированной по источнику углерода и энергии (глицерин или глюкоза). Нестабильный рекомбинантный штамм *E. coli* Z905 (изогенный бесплазмидный штамм *E. coli* K-12), содержал плазмиду pPHL-7, в составе которой находились клонированные под контролем *lac*-промотора в векторе pUC18 гены люминесцентной системы морских светящихся бактерий *P. leiognathi* (Илларионов и Протопопова, 1986).

Так как лактозный промотор является катаболическочувствительным (Neidhardt and Curtiss, 1996), тип лимитирующего рост субстрата - глицерин или глюкоза - изменял эффективность экспрессии клонированных *lux*-генов, что (теоретически) должно приводить

к разной скорости элиминации плазмидсодержащих клеток. Действительно, как видно из экспериментальных данных, приведенных на рис. 4.1.5, длительность поддержания плазмидных клеток на среде с глюкозой (в генерациях) значительно выше, чем на среде с глицерином. Это связано с тем, что при выращивании на среде с глюкозой наблюдается катаболитная репрессия люминесцентного оперона, которая снимается при культивировании на среде с глицерином (Попова и др., 1992).

2

1

Рис. 4.1.5. Длительность поддержания рекомбинантного штамма *E.coli* Z905, содержащего плазмиду рPHL-7 при культивировании на различных субстратах. 1- при культивировании на глицерине (как источнике углерода и энергии), 2 - то же на глюкозе. Точки - экспериментальные данные из (Попова и др., 1992), непрерывные линии - численное решение модели (4.1.1) с параметрами $\mu_{max} = 0.11 \text{ час}^{-1}$, $S_0 = 100$, $K_s = 10$, $\mu_{min} = 0.001$ (на глицерине), $\mu_{max} = 0.036$ (на глюкозе), $\mu_{min} = 0.001$ (на глюкозе), $\mu_{max} = 0.001$ (на глицерине).

С помощью разработанных методов (приближение квази-стационарности, выр. (4.1.9)-(4.1.11) и приближение постоянного селективного коэффициента, выр. (4.1.19)), а также метода нелинейной регрессии (4.1.16) мы оценили параметры рекомбинантного штамма при этих условиях культивирования (см. рис. 4.1.5 и табл. 4.1.2). Во-первых, мы нашли, что хотя и наблюдается значительный разброс в оцененных значениях в зависимости от примененного метода, общий тренд очевиден: стоимость плазмиды при культивировании на среде с глицерином () оказывается значительно выше, чем при культивировании на среде с глюкозой (). Отметим, что такие высокие значения селективного коэффициента обычно не наблюдаются для природных или

1	глицерин	глюкоза	глюкоза	глюкоза	глюкоза	глюкоза	глюкоза
2	глицерин						

векторных плазмид (Вое, 1996; Вое and Rasmussen, 1996), что уже само говорит о том, что экспрессия генов, клонированных в плазмиде (в данном случае это *lux*-оперон), является важным (если не основным) фактором, определяющим стоимость плазмид для клеток-хозяев в данных условиях культивирования.

Табл. 4.1.2. Оценка параметров плазмиднесущего штамма при культивировании в хемостате: 1 – с разными сахарами как источниками углерода и энергии (из Попова и др., 1992), 2 – при различных скоростях потока среды D (Wouters et al., 1980). Методы: 1 – нелинейная регрессия в соответствии с выражением (4.1.16), 2 – нелинейная регрессия в соответствии с выражением (4.1.19), 3 – частичная регрессия начальных и конечных точек (данных) в соответствии с выражениями (4.1.9) и (4.1.11). * - разница статистически недостоверна ($P > 0.05$), • - разница статистически достоверна ($P < 0.05$).

Отметим также, что метод 1 (Davidson et al., 1990) дает значительно заниженную оценку на селективный коэффициент при культивировании на глицерине (которая является минимальной), так как не учитывает смену времени генерации в хемостате. С другой стороны, метод 3, хотя и привел к похожим средним значениям, обладает большей погрешностью, чем все остальные методы, а, следовательно, в данном случае, не является наиболее точным. Например, из оценок для μ^* и μ_{max} видно, что селективный коэффициент меняется при замещении плазмидсодержащего штамма на бесплазмидный вариант (наиболее очевидно это при культивировании на глюкозе), однако разница не является статистически достоверной (см. табл. 4.1.2). Также отметим, что значения μ^* и полученные методом 2 достаточно близки при культивировании на глицерине, хотя значительное различие в оценках для μ_{max} очевидно. Таким образом, нуль гипотеза, что μ^* , не подтверждается данными (μ^* и μ_{max} статистически неразличимы), а, следовательно, метод 2 может быть использован для оценки вероятности потери плазмид при делении плазмидсодержащих клеток.

Оценка вероятности появления бесплазмидной клетки μ_{max} также оказалась зависимой

от субстрата, используемого при культивировании: на глюкозе вероятность потери плазмиды была на порядок выше ($10^{-1.2} \times 10^{-3}$), чем при культивировании на глицерине ($10^{-2.2}$). Такой же тренд прослеживается при оценке μ_{pl} методом 1 (см. табл. 4.1.2, разница в оценках для разных субстратов методами 1 и 3 статистически не достоверна). Этот результат в некотором смысле интересен, так как мы ожидали *увеличение* скорости потери плазмид при делении при эффективной экспрессии плазмидных генов, что может быть связано с конкуренцией РНК и ДНК полимераз при транскрипции и репликации плазмидной ДНК (оценки, полученные методом 3, подтверждают увеличение сегрегационной нестабильности при высоком уровне экспрессии плазмидных генов, хотя разница в полученных значениях статистически недостоверна, см. табл. 4.1.2). Однако, наши результаты демонстрируют, что если этот процесс и происходит, он или незначителен, или маскируем каким-нибудь альтернативным процессом, ведущим к снижению вероятности образования бесплазмидных клеток. К настоящему времени мы не можем предложить адекватного объяснения этого результата. Возможно, что при высоких селективных коэффициентах точная оценка вероятности потери плазмиды не может быть получена, так как даже небольшая начальная фракция бесплазмидных клеток, генерированная в начале культивирования, может значительно изменить последующую динамику (не показано и (Duetz and van Andel, 1991; Duetz et al., 1991)).

Суммируя, мы обнаружили, что эффективная экспрессия клонированных в плазмиде генов влияет на стабильность плазмидсодержащих штаммов. В экспериментах Поповой с соавт. (1992) это в основном связано с увеличением селективного коэффициента при эффективной экспрессии клонированных в плазмиде генов. К сожалению, мы не смогли найти зависимость параметров μ_{pl} и μ_{pl} от эффективности экспрессии, так как уровень экспрессии не был опубликован. Однако в экспериментах, описанных в следующей части (часть 4.2), мы обнаружили, что селективный коэффициент штамма *E. coli* MG1655, содержащего плазмиду pGLO, был прямо пропорционален экспрессии гена *gfp* (зеленый флуоресцирующий протеин), клонированного в плазмиде.

Культивирование плазмидсодержащего штамма при разных протоках среды в хемостате. Второй пример, который мы рассмотрим, основан на классическом эксперименте, проведенном в Вoutersом с соавт. (Wouters et al., 1980), в котором авторы исследовали длительность поддержания рекомбинантного штамма *E. coli* PC 221 (вариант штамма *E. coli* K-12), содержащего плазмиду pBR322, при разных удельных скоростях разбавления

тивности экспрессии плазмидных генов/плазмиду (часто клонированных под энергозависимыми промоторами), которая в свою очередь ведет к снижению стабильности плазмидсодержащего штамма (при этом полное число копий плазмиды/хромосому не меняется); 2) с увеличением средней копийности плазмиды/хромосому при низких скоростях роста, что при конститутивной экспрессии клонированных в плазмиде генов приводит к повышению метаболической нагрузки на клетку-хозяина, а, следовательно, к более быстрой элиминации плазмидсодержащего штамма при низких скоростях протока среды в хеостате. В рассмотренном нами примере, неустойчивость плазмиды pBR322 связана в основном с экспрессией генов, кодирующих устойчивость к тетрациклину (Lee and Edlin, 1985; Vernet et al., 1985), что наблюдается также для некоторых других плазмид (Godwin and Slater, 1979; Noack et al., 1981). Экспрессия тет-оперона обычно конститутивна (Hillen and Berens, 1994), хотя в ряде случаев наблюдался и индуцибельный характер экспрессии (Hillen and Berens, 1994; Lenski et al., 1994b; Nguyen et al., 1989). Следовательно, увеличение стоимости плазмиды pBR322 при низких скоростях роста среды в хеостате скорее всего связано с увеличением относительной копийности плазмиды в клетках микроорганизмов.

Оценка вероятности образования бесплазмидной клетки различными методами привела к разным результатам, хотя тренд при использовании конкретного метода очевиден (табл. 4.1.2). Методы 1 и 2 предсказывают увеличение сегрегационной стабильности при низких удельных скоростях роста популяции, хотя, например, различие в оцененных значениях для разных D методом 1 статистически не достоверно (см. табл. 4.1.2). Снижение вероятности потери плазмиды при низких скоростях роста плазмидной популяции в некотором смысле неожиданно, хотя и было наблюдаемо для некоторых систем (Imrpoolsup et al., 1989).

Наиболее возможным кандидатом для объяснения этого феномена является влияние времени генерации плазмидсодержащей популяции микроорганизмов на среднюю копийность плазмид и на дисперсию среднего числа копий в популяции бактерий (Ганусов и др., 2001; Keasling and Palsson, 1989; Paulsson et al., 1998). Как было показано теоретически (см. выше) и экспериментально (Keasling and Palsson, 1989; Lin-Chao and Bremer, 1986), средняя копийность в популяции микроорганизмов (на единицу опт. плотн.) прямо пропорциональна времени генерации плазмидсодержащих клеток, а следовательно при низких скоростях роста средняя копийность является высокой (обратное также верно). Однако, учитывая изменение среднего объема клеток микроорганизмов при низких скоро-

стях роста популяции микроорганизмов (Churchward et al., 1982; Donachie, 1968), которое может также привести и к снижению средней копийности (Lin-Chao and Bremer, 1986), мы можем ожидать увеличение скорости потери плазмиды при низких протоках среды в хемостате, что, однако, противоречит нашим оценкам (Табл. 4.1.2). Возможно, что высоких скоростях роста плазмиды не успевают дореплицироваться до двойного числа (при недостаточно эффективном контроле копийности), и это, соответственно, приводит к образованию фракции плазмидных клеток с малой копийностью плазмиды (возрастает дисперсия распределения). Таким образом, снижение сегрегационной стабильности при высоких скоростях роста плазмиднесущей популяции скорее всего связано с уменьшением числа сегрегирующих единиц (плазмид либо мультимеров) в отдельных клетках, которое в свою очередь определяется точностью контроля копийности, который менее эффективен при высоких скоростях роста популяции микроорганизмов (Paulsson and Ehrenberg, 1998; Summers, 1996).

Заметим, что уменьшение μ при низких скоростях протока среды в хемостате не было обнаружено в предыдущих работах (Duetz et al., 1991; Dunn et al., 1995), одной из причин которого возможно является использование некорректного метода (метод 1).

Таким образом, с помощью разработанных методов оценки параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов, культивируемых в хемостате, мы показали, что популяционная неустойчивость рекомбинантных штаммов микроорганизмов при низких удельных скоростях разбавления среды в хемостате связана в основном с увеличением селективного преимущества бесплазмидных клеток, что не компенсируется возрастанием сегрегационной стабильности при низких D .

4.2. Экспериментальный и теоретический анализ связи экспрессии плазмидных генов и давления отбора, направленного против плазмидсодержащих клеток

В двух примерах, проанализированных в предыдущей части, мы обнаружили, что часто условия культивирования определяют длительность поддержания (а, следовательно, и стабильность) рекомбинантных штаммов микроорганизмов. Более того, применение предложенных методов оценки плазмидных параметров помогло нам определить, какой из этих параметров ответственен за наблюдаемое изменение в стабильности плазмидсодержащих клеток.

Однако с другой стороны, знание “наиболее существенного” параметра не отвечает на вопрос: чем изменение этого параметра (например, селективного коэффициента) обусловлено? Наша рабочая гипотеза предполагает, что в большинстве случаев изменение эффективности экспрессии клонированных в плазмиде генов ответственно за изменение параметров селективного коэффициента α и вероятности потери плазмид μ при изменении условий культивирования. Действительно, данные Поповой с соавт. (Попова и др., 1992) поддерживают эту гипотезу, так как экспрессия люминесцентного оперона является высокой на глицерине (большие μ) и малой на глюкозе (невысокие μ).

В этой части мы теоретически и экспериментально покажем, как экспрессия плазмидных генов, клонированных под катаболитчувствительными промоторами, влияет на удельную скорость роста популяции плазмидсодержащего штамма μ , а также экспериментально оценим как эффективность экспрессии генов α , клонированных в плазмиде, связана со стоимостью плазмиды μ .

Связь экспрессии плазмидных генов и скорости роста плазмидсодержащих клеток. Известно, что как природные, так и рекомбинантные плазмиды обычно содержат несколько различных генов, находящихся под контролем разного типа промоторов, обладающих конститивным либо индуцибельным характером (Бейли и Оллис, 1989; Atlung et al., 1999). В подавляющем числе случаев клонирование генов в рекомбинантных плаزمидах осуществляется под контролем промоторов, регуляция которых достаточно хорошо изучена, как, например, *lac*-, *trp*-, *sos*- промоторы (Бейли и Оллис, 1989). Также известно, что многие бактериальные промоторы (как, например, *lac*, *lux* и др.) подвержены катаболитной репрессии, особенно промоторы регуляции синтеза катаболизма сахаров, отличных от глюкозы (Бейли и Оллис, 1989; Дебабов и Лифшиц, 1988; Egli et al., 1993;

Lendenmann & Egli, 1995; Lendenmann *et al.*, 1996; Marr, 1991). Катаболитная репрессия обычно действует через снижение внутриклеточной концентрации комплекса сАМР-САР, в обычных условиях увеличивающего эффективность экспрессии бактериальных генов, находящихся под контролем, например, *lac*- промотора (Дебабов и Лифшиц, 1988; Neidhardt and Curtiss, 1996). Так как концентрация АТФ внутри клетки, определяемая концентрацией лимитирующего рост субстрата (при лимитировании по энергии), обратно пропорциональна концентрации сАМР (Дебабов и Лифшиц, 1988; Neidhardt and Curtiss, 1996), удельная скорость разбавления среды в хемостате может являться важной компонентой, задающей уровень экспрессии плазмидных генов. Мы, следовательно, основываясь на таком механизме регуляции экспрессии плазмидных генов, найдем связь между скоростью роста популяции плазмидсодержащих бактерий μ и эффективностью экспрессии клонированных в плазмиде генов E .

Пусть в клетке находится i копий плазмиды и, следовательно, i копий клонированного гена. Очевидно, что вероятность присоединения RNA- полимеразы к промотору клонированного гена (число промоторов = числу клонированных генов) на определенной плазмиде пропорциональна внутриклеточной концентрации регулятора A (под “регулятором” мы подразумеваем комплекс сАМР-САР), “сцепленного” с промотором, или $p = k_A / i$. Считая, что после присоединения RNA- полимеразы к промотору происходит образование полноценного транскрипта клонированного гена (который впоследствии будет протранслирован и, следовательно, экспрессирован), мы находим, что эффективность экспрессии пропорциональна вероятности считывания p , что в более общем случае приобретает вид (предполагая михаэлисо-ментеновскую зависимость):

$$\frac{E}{\mu} = \frac{k_A}{i} \cdot \frac{1}{1 + k_A / i} \quad (4.2.1)$$

Полная экспрессия клетки с i копиями плазмиды находится из выражения (см. рис. 4.2.1):

$$E = \mu \cdot \frac{k_A}{i} \cdot \frac{1}{1 + k_A / i} \quad (4.2.2)$$

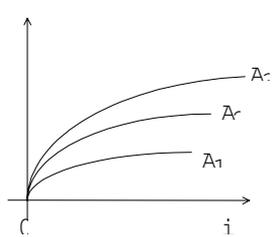


Рис. 4.2.1. Зависимость эффективности экспрессии клонированных генов ϵ от числа копий плазмиды в клетке при разных значениях регулятора A ($A_1 < A_2 < A_3$).

Следующий шагом нам необходимо найти связь между концентрацией регулятора A сАМР-САР и концентрацией субстрата в среде (точнее концентрацией АТР). сАМР образуется из АТР посредством фермента аденилатциклазы (Дебабов и Лифшиц, 1988 (Neidhardt and Curtiss, 1996), активность которого обратно пропорциональна концентрации АТР (Wong et al., 1997):

$$\dots \tag{4.2.3}$$

Подробный анализ показывает, что при ряде упрощающих предположений, концентрация сАМР зависит от концентрации субстрата в клетке (среде) следующим образом:

$$\dots \tag{4.2.4}$$

где λ_m - некоторая обобщенная константа, связанная со стехиометрией процесса (4.2.3), и n - пропорционально числу связывающих (ингибирующих) центров аденинциклазы.

Тогда эффективность экспрессии катаболитзависимых генов как функция концентрации субстрата и количества плазмид принимает вид:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \beta N, \tag{4.2.5}$$

где μ — удельная скорость роста, β — удельная скорость гибели, N_{max} — максимальная концентрация.

Пусть удельная скорость роста популяции микроорганизмов зависит от концентрации субстрата в среде по формуле Моно (Monod, 1949). Тогда учет влияния экспрессии рекомбинантных генов приводит к дополнительному члену, связанному с тратами на поддержание плазмид, не связанных с ростом микроорганизмов (Pirt, 1975):

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \beta N - \gamma N, \tag{4.2.6}$$

Подставляя явный вид экспрессии (4.2.5) в выражение (4.2.6) мы получаем обобщенную зависимость удельной скорости роста популяции микроорганизмов, содержащей рекомбинантные экспрессируемые плазмиды, как функция количества копий плазмиды и концентрации субстрата в среде (см. рис. 4.2.2):

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \beta - \gamma, \tag{4.2.7}$$

где μ — удельная скорость роста.

Два наблюдения мы хотели бы подчеркнуть. Во-первых, из рисунка 4.2.2 видно, что для штаммов микроорганизмов, содержащих активно функционирующие рекомбинантные плазмиды с $\gamma > 0$, существуют критические концентрации субстрата, отличные от нулевых, при которых рост бактерий прекращается и селективное преимущество бесплазмидных клеток $\mu = 0$ максимально, т.е. равно единице. Для простейшего случая $\beta = 0$, эта концентрация субстрата находится из выражения:

$$S_{crit} = \frac{K_s}{1 - \frac{\mu_{max}}{\mu_{max} + \gamma}}. \tag{4.2.8}$$

Во-вторых, в отличие от предположения Пирта (Pirt, 1975), мы обнаружили, что затраты на поддержание плазмид не являются постоянной функцией (у Пирта $\gamma = \text{const}$), а

зависят от концентрации субстрата (или, что является более общим, от скорости роста популяции микроорганизмов). Однако необходимо отметить, что даже при постоянных затратах на поддержание плазмид, определенных в уравнении (4.2.6) при $\mu = \mu_{max}$, селективный коэффициент увеличивается при низких удельных скоростях разбавления среды в хемостате (не показано).

Рис. 4.2.2. Зависимость удельной скорости роста популяции микроорганизмов μ от концентрации субстрата в хемостате (рассчитано по формуле 4.2.7). μ_{max} — максимальная удельная скорость роста, K_s — константа полунасыщения. Непрерывная кривая — μ и K_s (бесплазмидный вариант), штрихованная — μ и K_s (плазмидсодержащий вариант).

Таким образом, повышение эффективности экспрессии катаболитчувствительных плазмидных генов (Lendenmann et al., 1996) может объяснить драматическое возрастание селективного коэффициента при низких скоростях протока среды в хемостате (что эквивалентно стационарной концентрации субстрата, т.к. $\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$). Этот результат впервые получен и объяснен теоретически, хотя экспериментальная зависимость скорости роста популяции плазмидсодержащего штамма от скорости протока среды в хемостате (концентрации субстрата), изображенная на рис. 4.2.2, могла бы быть получена при обработке некоторых экспериментальных данных (Aiba et al., 1982; Duetz and van Andel, 1991; Godwin and Slater, 1979; Imanaka et al., 1980).

Отметим интересное наблюдение, обнаруженное нами при анализе экспериментальных данных, опубликованных в (Duetz and van Andel, 1991; Godwin and Slater, 1979). В обеих работах авторы оценили стоимость плазмиды σ при разных удельных скоростях разбавления среды в хемостате (в сегрегационных и конкурентных экспериментах). Со-

гласно выражению (4.2.6) при постоянной полной экспрессии плазмидных генов μ_{pl} , селективное преимущество бесплазмидных клеток выражается тогда согласно выражению:

$$\frac{\mu_{pl}}{\mu_{total}} = \frac{m}{1 + mD}, \quad (4.2.9)$$

где скорость роста бесплазмидной популяции может быть аппроксимирована как $\mu_{total} \approx \mu_{pl}$. Тогда, если зависимость селективного коэффициента от $1/D$ представляет прямую линию, мы можем утверждать, что траты на поддержание плазмид не зависят от скорости роста плазмидной популяции.

Рис. 4.2.3. Зависимость селективного коэффициента $\frac{\mu_{pl}}{\mu_{total}}$ от скорости разбавления среды в хеостате D (обработано из (Duetz and van Andel, 1991; Godwin and Slater, 1979)). Траты на поддержание плазмид составили 0.11 час^{-1} для плазмиды TP120 и 0.04 час^{-1} для плазмиды pWW0. Отметим, что пересечение регрессионных кривых с осью абсцисс статистически неотлично от нуля.

Интересно заметить, что независимость m от метаболического состояния клеток в хеостате действительно было обнаружено при культивировании плазмиды pWW0 (при лимитировании роста сукцинатом) и TP120 (при лимитировании роста глюкозой), что изображено на рис. 4.2.3. Подобная постоянность трат на поддержания демонстрирует удивительную координированность экспрессии некоторых плазмид, в которых эффективность

удельной экспрессии и копияность плазмиды скомпенсированы при разных скоростях роста плазмиднесущей популяции. Необходимо однако подчеркнуть, что показанная постоянность m не является универсальным признаком рекомбинантных плазмид и вообще говоря зависит от условий культивирования (т.е. типа лимитирования, уровня экспрессии плазмидных генов и т.п.). Например, селективный коэффициент зависел нелинейно от обратной величины скорости разбавления среды в хемостате для штамма с плазмидой TP120 при лимитировании по фосфору или для штамма *P. putida*, содержащего плазмиду pWW0, культивировании в присутствии неметаболизируемого индуктора (не показано, (Duetz et al., 1996; Godwin and Slater, 1979)).

В случае, когда экспрессия плазмидных генов (траты на поддержание) не являются постоянными, мы заметим, что стационарная концентрация субстрата в хемостате определяет как уровень экспрессии плазмидных генов, так и скорость роста плазмидсодержащих клеток; тогда исключая концентрацию субстрата σ из выражений (4.2.5) и (4.2.7), мы находим *фундаментальную связь экспрессии плазмидных генов и удельной скорости роста популяции плазмидсодержащих микроорганизмов* (или, другими словами, метаболического состояния бактерий, см. Дебабов и Лифшиц, 1988):

$$\frac{\mu}{\alpha} = \frac{\beta}{\sigma} \frac{1}{1 + \frac{\sigma}{K_m}}, \quad (4.2.10)$$

где β_{\max} и α_{\max} - максимальный уровень экспрессии клонированных генов и максимальная скорость роста популяции микроорганизмов, α и n определены выше,

Выражение (4.2.10) утверждает, что эффективность экспрессии плазмидных генов, находящихся под контролем катаболитчувствительных промоторов определяется в первую очередь метаболическим состоянием бактериальной клетки (скоростью роста), а не концентрацией лимитирующего рост фактора. Как следствие, формула (4.2.10) предсказывает, что при скоростях роста популяции, близких к максимальным, экспрессия генов, клонированных на плазмиде, является бесконечно малой, тогда как недостаток энергетического субстрата (напомним, что мы рассматриваем лимитирование по энергии) приводит к снятию репрессии с клонированных генов, к “открыванию” катаболитчувствительных промоторов, и соответственно, к многократному усилению эффективности экспрессии плазмидных генов (Neidhardt and Curtiss, 1996). Заметим, что так как в выражение

(4.2.10) не входят явным образом параметры внешних условий (как, например, концентрация лимитирующего рост субстрата, температура, pH и т.п.), это оказывается неважным какой способ применяется для изменения удельной скорости роста популяции плазмидсодержащих бактерий - удельная скорость разбавления среды в хемостате D или температура в pH-стате. Верность этого утверждения продемонстрирована на рис. 4.2.4.

Рис. 4.2.4. Связь экспрессии клонированных в плазмиде генов и удельной скорости роста популяции плазмидсодержащего штамма. Верхний график - культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* Z905 с плазмидой pPHL-7 в pH-стате при разных температурах (обработано из (Грицюк и др., 1999)), и Нижний график - культивирование рекомбинантного штамма *P. putida* mt-2 с плазмидой pWW0 при разных скоростях разбавления среды в хемостате (обработано из (Duetz et al., 1996)), и Точки – экспериментальные данные, непрерывные кривые – теория (выражение (4.2.10)).

Нелинейная связь между скоростью роста плазмиднесущей популяции и эффективностью экспрессии плазмидных генов была впоследствии подтверждена в экспериментах по культивированию штамма *Escherichia coli* Z905, содержащего рекомбинантную плазмиду pPHL-7, в составе которой находились клонированные под *lac*-промотором в векторе pUC18 гены люминесцентной системы морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* в pH-стате (Грицюк и др., 1999; Брильков и др., 2001).

Так как рост бактерий в pH-стате (аналоге турбидостата; Печуркин, 1978; Печуркин и др., 1990) является нелимитируемым, авторы использовали изменение температурного режима культивирования (15⁰С до 32⁰С) для моделирования отклонений удельной скорости роста микробной популяции от максимально возможной μ_{max} , достигаемой, очевидно, для *E. coli* К-12 при 37⁰С.

Нелинейная зависимость экспрессии люминесцентных генов от метаболического состояния клеток, задаваемое температурой культивирования, достаточно точно описывается предсказываемым выражением (4.2.10), что и изображено на рис. 4.2.4 непрерывной линией. Аналогичный результат (что впрочем немного удивительно) был также получен при культивировании штамма *P. putida* mt-2, содержащего рекомбинантную плазмиду pWW0, при разных скоростях разбавления среды в хемостате (Duetz et al., 1996) (см. рис. 4.2.4).

Плаزمида pWW0, использованная в этом эксперименте, кодировала два основных фермента (BADH и C230), обеспечивающих метаболическую переработку тяжелых углеводов, например, таких как тоулин и *m*- и *p*- кселин (TOL pathway). В работе (Duetz et al., 1996) авторы рассматривали влияние типа лимитирования и скорости роста плазмидсодержащей популяции на эффективность экспрессии прямого (BADH) и альтернативного пути (C230) переработки углеводов в присутствии насыщающих концентраций неметаболизируемого индуктора *o*- кселина. Они обнаружили, что при лимитировании роста бактерий по источнику углерода и энергии (сукцинат) активность фермента C230 (как впрочем и BADH, что не показано здесь) была обратно пропорциональна удельной скорости разбавления среды в хемостате D или, что тоже самое, метаболическому состоянию клеточного аппарата. Этот результат (вместе с предсказываемым теоретически) продемонстрирован на рис. 4.2.4 (нижний график).

К сожалению, сравнение экспериментальных данных (Duetz et al., 1996) и (Грицюк и др., 1999) по оцененным параметрам α и n не представляется легкой задачей, как это бы-

ло проведено для α и n (селективный коэффициент) в предыдущей части. И хотя параметры α и n (заметим, что эти параметры также являются безразмерными) имеют некоторую биологическую основу, которую мы обнаружили при подробном выводе выражения (4.2.5), мы все же будем рассматривать эти параметры как некоторые феноменологические константы. Однако одно наблюдение все может быть сделано. Замечая, что так как α , из оценки α для плазмиды pWW0 и n для pPHL-7 мы находим, что средняя копияность плазмиды pWW0 должна быть гораздо меньше, чем pPHL-7. Это наблюдение действительно подтверждается экспериментальными данными, так как известно, что плазмиды биодegradации в основном являются большими и малокопийными (Печуркин и др., 1990), тогда как pPHL-7 обычно имеет более 20 копий на клетку (Илларионов и Протопопова, 1986). Таким образом, в этой части мы показали, что эффективная экспрессия клонированных в плазмиде генов может значительным образом влиять на скорость роста плазмидсодержащего штамма, более того, селективное преимущество бесплазмидных клеток в хемостате зависит от скорости разбавления среды D (рис. 4.2.2 и рис. 4.2.3). Более того, мы обнаружили, что снижение скорости роста плазмидных клеток ниже оптимальной (через изменение температуры или скорости протока среды в хемостате) приводит к непропорционально высокой эффективности экспрессии плазмидных генов.

Существенным предположением при выражения (4.2.7) являлось то, что снижение удельной скорости роста плазмидсодержащих клеток происходит пропорционально экспрессии клонированных в плазмиде генов, т.е. в соответствии с предложением Пирта о тратах на поддержание (Pirt, 1975):

или, другими словами, селективный коэффициент пропорционален эффективности экспрессии плазмидных генов α (см. выр.(4.2.9)). Эта гипотеза была исследована при культивировании рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655, содержащего плазмиду pGLO (gfp^+ , amp^r) при последовательных пассажах в периодической культуре. В результате наших экспериментов мы обнаружили, что стоимость плазмиды действительно пропорциональна эффективности экспрессии клонированных в плазмиде генов, влияющая таким образом на стабильность поддержания плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов при периодическом (и возможно непрерывном) культивировании.

Влияние эффективности экспрессии клонированных в плазмиде генов на стоимость плазмиды. Несмотря на большой набор данных о стабильности плазмиднесущих бактерий, существующий в литературе, удивительно мало известно о количественной стороне во-

проса как присутствие рекомбинантных плазмид влияет на скорость роста популяции микроорганизмов, их содержащих. Как мы уже упоминали выше, первое понимание пришло из работы (Zund & Lebek, 1980), которая также получила продолжение в совсем недавней статье (Smith & Bidochka, 1998). Zund и Lebek обнаружили, что большие (100 т.п.о.) и многокопийные (100 копий на клетку) плазмиды часто снижают скорость роста плазмидсодержащей популяции микроорганизмов, хотя и количественная связь предложена не была. Позднее, Нгуен с соавт. при культивировании штамма *E.coli* K-12 в серии последовательных периодических культур показали, что стоимость плазмиды pBT107 (селективный коэффициент 1) была пропорциональна концентрации индуктора ангидротетрациклина, добавленного в среду и индуцирующего экспрессию тетрациклинового оперона с транспозона Tn10 (Nguyen et al., 1989). Качественно подобный результат был найден в работе (Lee and Edlin, 1985), где авторы манипулировали генетическим составом плазмиды и обнаружили, что экспрессия генов с тетрациклинового оперона ответственно за кинетическую нестабильность плазмиды pBR322. Однако, существенный недостаток этих работ заключается в том, что уровень экспрессии плазмидных генов не был измерян в ходе эксперимента. Это связано, в основном, с трудностью измерения экспрессии без наличия хорошего маркера. Мы, с другой стороны, постарались ответить на этот вопрос, используя плазмиду pGLO (Bio-rad, inc; <http://www.bio-rad.com>), в составе которой находится клонированный под контролем арабинозного промотора *araBAD* ген, кодирующий “зеленый флуоресцирующий протеин” (Green Fluorescent Protein или просто GFP).

GFP является достаточно распространенным маркером, используемым для детектирования различного рода процессов: начиная от мечения ДНК и РНК (Jons and Mettenleiter, 1997; Leff and Leff, 1996; Lobner-Olesen, 1999) и заканчивая визуализацией конкретных белков (Chalfie et al., 1994; Li et al., 1998). GFP не требует никаких дополнительных субстратов или регуляторов (для экспрессии люциферазы, например, необходим синтез ауторегулятора (Илларионов и Протопопова, 1986)), единственной необходимой для “созревания” фермента компонентой является кислород, что в большинстве случаев имеется в избытке при культивировании микроорганизмов. GFP также является хорошо изученным флуоресцентным белком как с кинетических, так и со структурных позиций (Tsien, 1998; Wilson and Hastings, 1998). Облучение GFP ультрафиолетовым светом (обычно 400-450 нм) приводит к свечению GFP зеленой области спектра с длиной волны 500-550 нм (отсюда и название “зеленый”). Очевидно, что измеряемая флуоресценция пропорциональна концентрации субстрата (т.е. GFP), что может служить инди-

катором эффективности экспрессии гена *gfp* при его клонировании в плазмиде. В нашей работе мы использовали GFP с очень большим временем полураспада, хотя ряд нестабильных белков был также получен (Andersen et al., 1998). И последним, но также очень важным является факт того, что в нашей плазмиде GFP клонирован под контролем *ara* промотора, уровень считывания, с которого очень четко определяется как концентрацией индуктора (арабинозы либо неметаболизируемого аналога), так и концентрацией глюкозы, так как этот промотор подвержен катаболитной репрессии (Guzman et al., 1995; Neidhardt and Curtiss, 1996). Таким образом, измеряя экспрессию GFP при различных условиях и одновременно оценивая селективный коэффициент, мы можем определить “стоимость” эффективной экспрессии плазмидных генов для клетки - хозяина. Для измерения селективного преимущества бесплазмидных клеток в периодической культуре мы использовали метод, описанный в ряде работ (Levin et al., 2000; Nguyen et al., 1989; Reynolds, 2000) и более подробно исследован нами (Ganusov and Brilkov, 2001).

Кратко, 5 мкл изначально гомогенных культур плазмидсодержащего (выращен в присутствии ампициллина, 200 мкг/мл) и бесплазмидного штамма *E. coli* K-12 MG1655 (Reynolds, 2000) пересаживались в свежую среду в равном отношении (1:1), выращивались до стационарной фазы в течение суток (см. рис. 1.1.2). Затем 10 мкл культуры, находящейся в стационарной фазе, пересаживалось в 5 мл новой (свежей) среды (следовательно, разбавление 10^{-3}), и бактерии опять выращивались до стационарной фазы. Этот процесс повторялся (перенос в колбу со свежей идентичной средой), пока концентрация плазмиднесущих клеток была детектируема (в отношении 1:200-400). Отношение плазмидных клеток к бесплазмидным (и полное число клеток в 1 мл) вычислялось при высеве культуры на агар с арабинозой, где с помощью УФ лампы мы визуализировали светящиеся (а, следовательно, содержащие GFP) клетки (присутствие плазмиды также проверялось при высеве на плотную среду, содержащую 50 мкг/мл ампициллина). Значение экспрессии плазмидсодержащих клеток измерялось с помощью интегрального флуориметра (Sequoia-Tuner Corporation), с объема 270 мкл культуры. Экспрессия GFP на клетку (либо на единицу оптической плотности) пересчитывалась при учете числа плазмиднесущих клеток в популяции. Селективный коэффициент вычислялся согласно предложенному методу (4.1.9) с модификацией:

$$\text{---} \quad , \quad (4.2.11)$$

где также z - отношение числа бесплазмидных клеток к плазмидсодержащим, d - фактор разбавления культуры (в нашем эксперименте $d = 10^{-3}$), N - число последовательных пассажей (Ganusov and Brilkov, 2001).

Таким образом, вычисляя тангенс угла наклона (в логарифмических координатах) кривой $z(N)$ и деля его на логарифм d , мы можем определить селективный коэффициент штамма с определенным уровнем экспрессии плазмидных генов (на генерацию). Стандартная минимальная среда Девиса (DM) с лимитированием по азоту была использована для роста бактерий с добавлением 2 мкг/мл тиамина, 100 мкг/мл $MgSO_4$ и 20 мкг/мл урацила (Reynolds, 2000). Сульфат азота ($(NH_4)_2SO_4$) использовался в концентрации 100 мкг/мл (норма - 1000 мкг/мл), сахар (лактоза) - 8 (или 6) мг/мл (норма 500 мкг/мл). Для индукции экспрессии GFP оперона мы использовали различные концентрации арабинозы - от минимального 200 мкг/мл до максимальных 6 мг/мл. Так как в стационарной фазе культура лимитировалась по азоту (проверено), и ввиду того, что бактерии потребляют лактозу, как наиболее легко усвояемый сахар после глюкозы (Lendenmann et al., 2000; Monod, 1949; Neidhardt and Curtiss, 1996), арабиноза даже в больших концентрациях не влияла на скорость роста бактерий, а выступала только в роли индуктора экспрессии GFP (проверено по скоростям роста с и без арабинозы в среде).

Так как минимальная концентрация индуктора в наших экспериментах ($>1mM$) была гораздо больше полунасыщающих концентраций ($\sim 0.1 mM$), мы предполагаем, что все плазмидсодержащие клетки экспрессируют GFP при наличии арабинозы в среде, что, однако не наблюдается при очень низких концентрациях арабинозы ($<0.1mM$), где только часть популяции экспрессирует GFP (Siegele and Hu, 1997). Результаты экспериментов по конкуренции плазмидсодержащего штамма MG1655 и его бесплазмидного варианта в серии периодических культур изображены на рис. 4.2.5.

Таким образом, в результате наших экспериментов мы обнаружили удивительный факт, что снижение скорости роста плазмидсодержащих клеток из-за присутствия плазмидной ДНК pGLO происходит пропорционально экспрессии гена *gfp*, клонированного на плазмиде. Это и есть основной результат этой части.

Рис. 4.2.5. Зависимость селективного преимущества бесплазмидных клеток, характеризуемого параметром σ , от различного уровня экспрессии клонированного в плазмиде рGLO гена *gfp*. Верхний график - экспрессия, пересчитанная на плазмидсодержащую клетку, нижний график - экспрессия, пересчитанная на ед. опт. плотности плазмидной популяции.

Две особенности нашего эксперимента, однако, хотелось бы отметить. Во-первых, экспериментально измеряемая экспрессия плазмидных генов, хотя в целом и оказалась пропорциональной концентрации арабинозы, тем не менее, обладает достаточно большой

дисперсией (рис. 4.2.6). Это означает, что не всегда добавление фиксированного количества индуктора будет вызывать определенный уровень экспрессии плазмидных генов, а, следовательно, для выяснения зависимости селективного коэффициента от эффективности экспрессии плазмидных генов экспериментатор обязательно должен измерять уровень экспрессии, а не использовать концентрацию индуктора как показатель экспрессии плазмидных генов, что было, например, сделано в работе (Nguyen et al., 1989).

Рис. 4.2.6. Зависимость среднего уровня экспрессии гена *gfp* в стационарной фазе периодической культуры плазмидсодержащего штамма *E. coli* MG1655 от концентрации арабинозы в среде.

Заметим, также, что, так как один пассаж проводился в течение суток (засев, рост, стационарная фаза и следующий засев на свежую среду), измеряемый с помощью уравнения (4.2.11) селективный коэффициент σ включает в себя не только разницу в скоростях роста плазмидных и бесплазмидных клеток (что обычно измеряется в хемостате), но и разницу в лаг-фазе и выживаемости в стационарной фазе плазмидсодержащих и бесплазмидных клеток (см. например (Demma, 2001; Ganusov and Brilkov, 2001; Smith and Bidochka, 1998)).

Для подтверждения того, что увеличение селективного коэффициента при высокой эффективности экспрессии гена *gfp* связано с изменением удельной скорости роста плазмидсодержащих клеток, мы измерили скорость роста плазмидного штамма в лог-фазе при

разном уровне экспрессии GFP. Аналогичная линейная зависимость стоимости плазмиды от μ была обнаружена (рис. 4.2.7).

Рис. 4.2.7. Связь уровня селекции, направленного против плазмидсодержащих клеток и характеризуемого отношением максимальных скоростей роста плазмидной и бесплазмидной популяций ($\mu_{plasmid} / \mu_{no\ plasmid}$), измеренного в периодической культуре, и различной эффективности экспрессии клонированного в плазмиде pGLO гена *gfp*.

Два дополнительных доказательства также поддерживают нашу гипотезу, что снижение удельной скорости роста плазмидсодержащих клеток пропорционально эффективной экспрессии клонированных в плазмиде генов. Одно следует из работы (Duetz and van Andel, 1991), где селективный коэффициент может быть определен по приведенным данным при разных скоростях протока среды в хемостате (при лимитировании сукцинатом), и где уровень экспрессии одного из ферментов (C230), позволяющего метаболизировать тяжелые углеводороды (например, кселин и толуол), был также измерен. Зависимость стоимости плазмиды от эффективности экспрессии также как и в наших экспериментах со статистической достоверностью описывается линейной регрессией (рис. 4.2.8).

Похожий результат был получен в работе (Bentley et al., 1990), где максимальная удельная скорость роста бактериального штамма *E.coli* RR1, содержавшего плазмиду pBR329 (amp^r , cam^r и tet^r), негативно коррелировала с эффективностью экспрессии гена *cat* (хлорамфеникол-ацетил-трансфераза) при выращивании бактерий на разных средах в при-

сутствии разных концентраций хлорамфеникола (Bentley et al., 1990).

Рис. 4.2.8. Зависимость селективного преимущества бесплазмидных клеток, характеризуемого параметром σ , от различного уровня экспрессии генов плазмиды pWW0 (обработано из (Duetz and van Andel, 1991)).

Суммируя, в наших эксперименте мы, таким образом, обнаружили, что относительная разница в общей приспособленности плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов и изогенных бесплазмидных клеток (измеряемая селективным коэффициентом) пропорциональна эффективности экспрессии генов, клонированных в плазмиде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие новых экспериментальных методов и повышение точности экспериментальных данных способствует все большему внедрению техники количественного моделирования в естественные науки, как, например в биологию. В предложенной диссертации с помощью математических моделей мы проанализировали популяционную динамику штаммов микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды, при различных условиях управляемого культивирования. Главной особенностью разработанных математических моделей является учет наличия нескольких копий плазмиды в одной бактериальной клетке, что до настоящего времени не было рассмотрено в деталях. Мы обнаружили, что присутствие в клетке микроорганизмов нескольких копий плазмиды (копийность плазмиды) является важной биологической характеристикой, которая радиальным образом влияет на стабильность рекомбинантных штаммов при длительном культивировании. С помощью модели, описывающей популяционную динамику многокопийных микроорганизмов, мы, например, смогли объяснить ранее наблюдаемый эффект снижения селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании в хемостате, связанный (по модели) со снижением среднего числа копий плазмиды в клетках микроорганизмов. Этот подход к изучению динамики плазмиднесущих бактерий также позволил нам исследовать вопрос как эффективность экспрессии клонированных в плазмиде генов влияет на стабильность плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов при их длительном культивировании. Мы обнаружили, что “стоимость” рекомбинантных плазмид, измеряемая селективным коэффициентом, пропорциональна уровню экспрессии плазмидных генов, а также показали, что нестабильность генноинженерных микроорганизмов при различных протоках при культивировании в хемостате связана в основном с увеличением селективного преимущества бесплазмидных клеток и возможным повышением вероятности образования бесплазмидной клетки при делении плазмидсодержащей популяции. Несмотря на эти интересные результаты, предложенная модель является только первым шагом к пониманию всех сложностей взаимодействия плазмид микроорганизмов и их клеток-хозяев, шагом, который по нашему мнению, не должен быть последним.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Предложен новый теоретический подход, основанный на уравнении непрерывности, позволяющий описывать динамику численности многоплазмидных многокопийных штаммов микроорганизмов в различных условиях культивирования. На основании предложенного теоретического подхода, построена и проанализирована математическая модель популяционной динамики многокопийных плазмид с учетом негативного контроля репликации плазмид, кинетической и сегрегационной нестабильности рекомбинантных плазмид микроорганизмов.

2. С помощью математической модели показано, что вид зависимости удельной скорости роста и эффективности экспрессии плазмидных генов от копийности практически не влияет на квазистационарное распределение плазмид по клеткам, а определяется только механизмом негативного контроля копийности. При этом наличие экспрессии плазмидных генов приводит к большей скорости элиминации плазмид из хемостата, чем без нее.

3. Показано, что время полуэлиминации плазмид в популяции нестабильного рекомбинантного штамма в хемостате не зависит от максимального числа копий плазмиды в клетке, а определяется только средним временем генерации микробной популяции, скоростью потери плазмид клеткой и уровнем селективного давления на плазмидсодержащий штамм.

4. Впервые теоретически объяснен эффект снижения селективного давления на популяцию многокопийного генноинженерного штамма, связанный со снижением среднего числа копий плазмиды в клетках. Продемонстрировано, что удельная скорость роста популяции плазмидсодержащих микроорганизмов нелинейно зависит от числа копий плазмиды в клетках. Показано, что вариация клеточного объема в популяции плазмидсодержащего штамма является важной компонентой, определяющей сегрегационную стабильность плазмид.

5. Основываясь на простой модели Левина-Стюарта, разработаны два метода оценки параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов, а именно селективного коэффициента σ и вероятности потери плазмиды плазмидсодержащей клеткой при делении μ_p . Показано, что нестабильность генноинженерных штаммов микроорганизмов при низких удельных скоростях разбавления среды в хемостате связана в основном с увеличением селективного преимущества бесплазмидных клеток, при этом также отмечено увеличение сегрегационной стабильности плазмид при низких D .

6. Предложена и проанализирована модель эффективности экспрессии катаболит-чувствительных генов плазмиднесущих микроорганизмов. Показано, что селективное преимущество рекомбинантных штаммов зависит от скорости протока среды при культивировании в хемостате. Впервые объяснен эффект увеличения экспрессии люминесцентных генов плазмиды pPHL-7 при низких скоростях роста популяции рекомбинантного штамма *E.coli* Z905.

7. В экспериментах с рекомбинантным штаммом MG1655, содержащего клонированный ген *gfp* на плазмиде pGLO (gfp^+ , amp^r), обнаружена линейная связь между селективным коэффициентом α , характеризующим популяционную “стоимость” плазмиды, и эффективностью экспрессии гена *gfp*.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Брильков А.В., Печуркин Н.С., Ганусов В.В., Фишов В.В. (1996) Энергетические принципы устойчивого развития популяций и экосистем/ В сб.: VII Всероссийского симпозиума “Коррекция гомеостаза”. - Красноярск: Изд-во КНЦ СО РАН. - С.49-50
2. Brilkov, A.V., Baranova, E.A., Ganusov, V.V., Fishov, V.V., Popova, L.Y., Kargatova, T.V., Maksimova, E.E., Pechurkin, N.S. (1996) Evaluation of GEM introduction risk in the environment using laboratory microecosystems. *in* “Microbial diversity: current situation, conservation strategy, and ecological aspects”. - Perm, Russia, 1996. - p.154-155
3. Brilkov A.V., Fishov V.V., Kholostova Z.G., Babkin A.V., Ganusov V.V., Pechurkin N.S. (1996) Mathematical modeling of biotic cycle formation in ecosystems as basis for man and environment coexistence/ In: International ecological congress. - Voronezh, Russia. - p. 19
4. Ганусов В.В. (1997) Математическое моделирование процессов интродукции многокопийного рекомбинантного штамма в водные экосистемы/ В сб.: Конференция молодых ученых КНЦ СО РАН. - Красноярск: Изд-во КНЦ СО РАН. С. 23-24
5. Ганусов В.В., Брильков А.В. (1997) Исследование последствий интродукции многокопийного рекомбинантного штамма в водные экосистемы/ В сб.: Дополнительные материалы XXXV Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. - Новосибирск: Изд-во НГУ. - С.12- 13
6. Ганусов В.В., Брильков А.В. (1997) Математическое моделирование процессов непрерывного культивирования нестабильных многокопийных рекомбинантных штаммов/ В сб.: IV Всероссийская студенческая конференция “Экология и проблемы защиты окружающей среды”. - Красноярск: Изд-во КГУ. - С.125
7. Ганусов В.В., Брильков А.В. (1997) Структурный подход к математическому моделированию динамики плазмид в популяциях генноинженерных микроорганизмов/ В сб.: Тезисы Межрегиональной научной студенческой конференции “Физика и Современный Мир-97”. - Красноярск: Изд-во КГУ. - С.32-33
8. Ганусов В.В. (1998) Математическое моделирование нестабильности многокопийных рекомбинантных штаммов при длительном культивировании/ В сб.: Тезисы научной конференции студентов физиков НКСФ-98. - Красноярск: Изд-во КГУ. С.15
9. Ганусов В.В. (1998) Нестабильность многокопийных рекомбинантных штаммов при случайном распределении копий плазмиды по дочерним клеткам/ В сб.: “Студент, наука, цивилизация”. - Красноярск. С.13 – 14

10. Ганусов В.В. (1998) Математические модели динамики плазмиднесущих бактерий в непрерывной культуре/ В сб.: Третий сибирский конгресс по индустриальной и прикладной математике (ИНПРИМ-98). – Н.. - С.114
11. Ганусов В.В. (1998) Распределённые модели неравновесных систем: динамика многокопийных плазмид в хеостате/ В сб. Моделирование неравновесных систем-98. - Красноярск, Изд.-во КГТУ. С. 41 - 42
12. Ганусов В.В., Брильков А.В (1998) Теоретическая оценка влияния экспрессии плазмидных генов на популяционную динамику плазмид./ В сб.: Материалы XXXVI Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. Биология. - Новосибирск: Изд-во НГУ. - С.5
13. Ганусов В.В., Брильков А.В. (1998) Математическое моделирование популяционной динамики плазмид микроорганизмов/ В сб.: V Всероссийская студенческая конференция “Экология и проблемы защиты окружающей среды”. - Красноярск: Изд-во КГУ. С.120
14. Ганусов В.В., Брильков А.В. (1998) Математическое моделирование интродукции генетически модифицированных микроорганизмов в лабораторные и природные экологические системы/ В сб.: Новые направления в биотехнологии. - М.. - С.106
15. Ganusov, V. (1999) The estimates of parameters (α , τ) of the plasmid-bearing recombinant strains at the different environmental conditions/ В сб.: Материалы XXXVII Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. Биология. - Новосибирск: Изд-во НГУ. С.15
16. Ганусов В.В., Брильков А.В. (1999) Новый подход к моделированию динамики плазмид в популяциях микроорганизмов/ В сб.: Реконструкция гомеостаза. Красноярск. - С. 62-68
17. Грицюк Р.В., Ганусов В.В., Брильков А.В. (1999) Изменение экспрессии клонированных генов в зависимости от скорости роста популяции и физиологического состояния бактерий/ В сб.: Реконструкция гомеостаза. – Красноярск. - С. 69-73
18. Pechurkin, N.S., E.A. Baranova, A.V. Brilkov, V.V. Ganusov, T.V. Kargatova, E.E. Maksimova, L.Yu. Popova (1999) Modeling of genetically engineered microorganisms introduction in closed artificial microcosms. *Advances in Space Research* **24**(3): 335-41
19. Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. (1999). Структурный подход к моделированию популяционной динамики нестабильных рекомбинантных штаммов бактерий, содержащих многокопийные плазмиды. *ДАН* **397**: 267-270

20. Ганусов, В.В., А.В. Брильков и Н.С. Печуркин. (2000). Математическое моделирование динамики популяции нестабильных плазмидсодержащих штаммов бактерий при непрерывном культивировании в хемостате. *Биофизика* **45**(5), с. 908-914

21. Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. (2001) Популяционная динамика бактериальных плазмид. *Математическое моделирование* **13**(1): 77-98.

22. Babkin, A.V., A.V. Brilkov, V.V. Ganusov, N.S. Pechurkin Theoretical approach to biotic cycle formation in closed ecological systems. *Life Support & Biosphere Science* /принято к печати/

ЛИТЕРАТУРА

- Абросов Н.С., Ковров Б.Г., Черепанов О.А. (1982) Экологические механизмы сосуществования и видовой регуляции . - Новосибирск: Наука. Сиб.отдние.- 301 с.
- Апонин Ю.М. Популяционная динамика бактериальных плазмид в условиях хемостатного культивирования. - Препр./ОНИИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1982. - 18 с.
- Апонин Ю.М., Апонина Е.А., Вельков В.В. Математическое моделирование процессов непрерывного культивирования микроорганизмов, содержащих нестабильные гибридные плазмиды. - Препр./ОНИИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1984. - 21 с.
- Апонина Е.А., Апонин Ю.М., Вельков В.В. Кинетические коэффициенты плазмид и методология конструирования рекомбинантных ДНК - Препр./ ОНИИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1984. - 11 с.
- Апонин Ю.М., Апонина Е.А. О некоторых условиях устойчивого поддержания нестабильных плазмид в микробных популяциях при длительном непрерывном культивировании/ В кн.: Исследования по математической биологии. Сб. научных трудов, посв. памяти А.Д. Базыкина. - Пущино: Изд- во Пущинского научного центра РАН, 1996. - С. 32 - 48
- Баев А.А. Новые направления биотехнологии. *Биотехнология*. - 1985. - N 2. - С.8-14.
- Баев А.А., Быков В.А. Биотехнология - союз науки и производства. - М.: Сов.Россия, 1987. - 128 с.
- Базыкин А.Д. Математическая биофизика взаимодействующих популяций. - М.: Наука, 1985. - 181 с.
- Бейли Ж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. - М.:Мир, 1989, т.1 -692 с.
- Боронин А.М., Денисов Г.А., Лазарев П.И. Математические модели динамики численностей бактериальных плазмид. - Препр./ОНИИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1983. - 43 с.
- Боронин А.М. и др. Стабильность плазмид биodeградации нафталина NPL-1 и NPL41 в популяциях *Pseudomonas putida* в условиях непрерывного культивирования. - Микробиология. 1985. - Т. 54 - С. 610-615.
- Брильков А.В., Вологодская Л.В., Луцкая Н.И., Печуркин Н.С. Популяционная устойчивость плазмид. - Препр./ИБФ СО АН СССР. - Красноярск, 1990. - 56 с.
- Брильков А.В., Попова Л.Ю., Баранова Е.А., Максимова Е.А., Репета Т.В., Печуркин Н.С. Исследование выживания и распространения генноинженерных микроорганизмов в

- лабораторных водных экосистемах. *Доклады РАН*. - 1995. - Т.341. - N3.- С. 429-430.
- Брода П. Плазмиды. - М.: Мир, 1982. - 220 с.
- Вельков В.В. Нестабильность рекомбинантных молекул. *Генетика*. -1983. - Т.19, N 10. - С.1575-1581.
- Вельков В.В. Интродукция генетически модифицированных микроорганизмов в окружающую среду: Перспективы и риск. *Генетика*. - 1994. - Т.30, N 1. - С. 581 - 592.
- Волькенштейн М.В. (1978). Общая биофизика.- М.: Наука: 265 с.
- Ганусов В.В., Брильков А.В (1998). Теоретическая оценка влияния экспрессии плазмидных генов на популяционную динамику плазмид./В сб.: Материалы XXXVI Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. Биология. - Новосибирск: Изд-во НГУ: 5
- Ганусов В.В., Брильков А.В. (1999). Новый подход к моделированию динамики плазмид в популяциях микроорганизмов/ В сб.: Реконструкция гомеостаза. Красноярск: 62-68
- Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. (1999) Структурный подход к моделированию популяционной динамики нестабильных рекомбинантных штаммов бактерий, содержащих многокопийные плазмиды. *ДАН* **397**: 267-270
- Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. (2000) Математическое моделирование динамики популяции нестабильных плазмидсодержащих штаммов бактерий при непрерывном культивировании в хемостате. *Биофизика* **45**(5): 908-914
- Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. (2001) Популяционная динамика бактериальных плазмид. *Математическое моделирование* **13**(1): 77-98.
- Горбань, А.Н. (1990) Экстремальные принципы и априорные оценки в задачах биологической и формальной кинетики.- Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук. - Красноярск – 45 с.
- Грицюк Р.В., Ганусов В.В., Брильков А.В. (1999). Изменение экспрессии клонированных генов в зависимости от скорости роста популяции и физиологического состояния бактерий/ В сб.: Реконструкция гомеостаза. –Красноярск: 69-73
- Дебабов В.Г. (1985) Генетика микроорганизмов и задачи биотехнологии. *Основные направления генетики микроорганизмов*. - М.:- С.6-7.
- Дебабов В.Г. (1987) Генная инженерия промышленно важных микроорганизмов. *Изв.АН СССР. Сер.биол.* - N 3. - С.325-340.
- Дебабов В.Г., Лившиц В.А. (1988) Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. - М.:Высш.шк. - 208 с.

- Динамическая теория биологических популяций/ под ред. Р.А. Полуэктова. - М.: Наука, 1974. - 455 с.
- Илларионов Б.А., Протопопова М.В. Клонирование и экспрессии генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* в плазмидном векторе pUC-18.- Препр./Ин-т физики им.Л.В. Киренского СО АН СССР. - Красноярск, 1986
- Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория поля. - М.: Наука, 1973. - 504 с.
- Климонтович Ю.Л. Статистическая физика. - М.: Наука, 1982.
- Печуркин Н.С. Популяционная микробиология. - Новосибирск:Наука. Сиб. отдние, 1978. - 207 с.
- Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. Популяционные аспекты биотехнологии. - Новосибирск: Наука,1990.- С.1-172.
- Попова Л.Ю., Максимова Е.Е., Репета Т.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. Экспрессия клонированных генов бактериальной люминесценции у микроорганизмов, выделенных из лабораторных микрокосмов // Биотехнология.- 1994. - N5. - С.6-10.
- Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическое моделирование в биофизике. - М.: Наука, 1975. - 344 с.
- Свиричев Ю.М., Логофет Д.О. Устойчивость биологических сообществ. - М.: Наука, 1978. - 352 с.
- Свиричев Ю.М. Математические модели биологических сообществ. В сб. Математическая биология и медицина. Т.1. - М.: Наука, 1978. - С. 117- 165.
- Свиричев Ю.М., Пасеков В.П. Основы математической генетики. - М.: Наука, 1974. - 455 с.
- Степанова Н.В. Математические модели непрерывной культуры микроорганизмов, распределенных по возрастам и размерам/ В сб.: Математические модели в экологии. - Горький: ГГУ, 1980. - С.95 - 113.
- Щелкунов С.Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. - Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1986. - 168 с.
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1998) Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci*, **4**, D43-62.
- Ai, S. (2001) Periodic solutions in a model of competition between plasmid-bearing and plasmid-free organisms in a chemostat with inhibitor. *J Math Biol*, **42**, 71-94.
- Aiba, S., Tsunekawa, H. and Imanaka, T. (1982) New approach to tryptophan production by

- Escherichia coli: genetic manipulation of composite plasmids in vitro. *Appl Environ Microbiol*, **43**, 289-97.
- Akerlund, T., Nordstrom, K. and Bernander, R. (1995) Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of Escherichia coli. *J Bacteriol*, **177**, 6791-7.
- Anderson, K.R., Mendelson, N.H. and Watkins, J.C. (2000) A new mathematical approach predicts individual cell growth behavior using bacterial population information. *J Theor Biol*, **202**, 87-94.
- Anderson, R.M. and May, R.M. (1991) *Infectious diseases in humans: dynamics and control*. Oxford University Press, New York.
- Atlung, T., Christensen, B.B. and Hansen, F.G. (1999) Role of the rom protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in Escherichia coli K-12. *Plasmid*, **41**, 110-9.
- Austin, S. and Nordstrom, K. (1990) Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell*, **60**, 351-4.
- Awong, J., Bitton, G. and Chaudhry, G.R. (1990) Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*, **56**, 977-83.
- Ayala-Sanmartin, J. and Gomez-Eichelmann, M.C. (1989) Stability of ColE1-like and pBR322-like plasmids in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, **3**, 1745-52.
- Bailey, J.E., Da Silva, N.A., Peretti, S.W., Seo, J.H. and Srienc, F. (1986) Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms. *Ann N Y Acad Sci*, **469**, 194-211.
- Bailey, J.E., Hjortso, M., Lee, S.B. and Srienc, F. (1983) Kinetics of product formation and plasmid segregation in recombinant microbial populations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **413**, 71-87.
- Bentley, W.E., Mirjalili, N., Andersen, D.C., Davis, R.H. and Kompala, D.S. (1990) Plasmid-encoded protein: the principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng*, **35**, 668-81.
- Bergstrom, C.T., Lipsitch, M. and Levin, B.R. (2000) Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids [In Process Citation]. *Genetics*, **155**, 1505-19.
- Bernander, R. and Nordstrom, K. (1990) Chromosome replication does not trigger cell division in E. coli. *Cell*, **60**, 365-74.

- Blomberg, P., Nordstrom, K. and Wagner, E.G. (1992) Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *Embo J*, **11**, 2675-83.
- Blomberg, P., Wagner, E.G. and Nordstrom, K. (1990) Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. *Embo J*, **9**, 2331-40.
- Boe, L. (1996) Estimation of plasmid loss rates in bacterial populations with a reference to the reproducibility of stability experiments. *Plasmid*, **36**, 161-7.
- Boe, L., Gerdes, K. and Molin, S. (1987) Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *Journal of Bacteriology*, **169**, 4646-50.
- Boe, L. and Rasmussen, K.V. (1996) Suggestions as to quantitative measurements of plasmid loss. *Plasmid*, **36**, 153-9.
- Boe, L. and Tolker-Nielsen, T. (1997) Plasmid stability: comments on the dimer catastrophe hypothesis. *Molecular Microbiology*, **23**, 247-53.
- Bouma, J.E. and Lenski, R.E. (1988) Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature*, **335**, 351-2.
- Bremer, H. and Lin-Chao, S. (1986) Analysis of the physiological control of replication of ColE1-type plasmids. *Journal of Theoretical Biology*, **123**, 453-70.
- Brendel, V. and Perelson, A.S. (1993) Quantitative model of ColE1 plasmid copy number control. *J Mol Biol*, **229**, 860-72.
- Brenner, M. and Tomizawa, J. (1991) Quantitation of ColE1-encoded replication elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 405-9.
- Brooks, R.F. (1981) Random transitions and cell cycle control. *Prog Clin Biol Res*, **66**, 593-601.
- Brooks, R.F., Bennett, D.C. and Smith, J.A. (1980) Mammalian cell cycles need two random transitions. *Cell*, **19**, 493-504.
- Brooks, R.F., Smith, J.A., Bennett, D.C. and Richmond, K.M. (1981) 'G1 rate' model of cell cycle--a realistic alternative to 'transition probability'? [letter]. *Nature*, **293**, 680-1.
- Brownlie, L., Stephenson, J.R. and Cole, J.A. (1990) Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* HB101(pAT153). *J Gen Microbiol*, **136**, 2471-80.
- Bugeja, V.C., Kleinman, M.J., Stanbury, P.F. and Gingold, E.B. (1989) The segregation of the 2 μ -based yeast plasmid pJDB248 breaks down under conditions of slow, glucose-limited growth. *J Gen Microbiol*, **135**, 2891-7.
- Caulcott, C.A. (1984) Competition between plasmid-positive and plasmid-negative cells.

- Biochemical Society Transactions*, **12**, 1140-2.
- Caulcott, C.A., Dunn, A., Robertson, H.A., Cooper, N.S., Brown, M.E. and Rhodes, P.M. (1987) Investigation of the effect of growth environment on the stability of low-copy-number plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, **133**, 1881-9.
- Caulcott, C.A., Lilley, G., Wright, E.M., Robinson, M.K. and Yarranton, G.T. (1985) Investigation of the instability of plasmids directing the expression of Met-prochymosin in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, **131**, 3355-65.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-5.
- Chiang, C.L. (1980) *An introduction to stochastic processes and their applications*. R. E. Krieger Pub. Co., Huntington, N.Y.
- Chiang, C.S. and Bremer, H. (1988) Stability of pBR322-derived plasmids. *Plasmid*, **20**, 207-20.
- Chiang, C.S. and Bremer, H. (1991) Maintenance of pBR322-derived plasmids without functional RNAI. *Plasmid*, **26**, 186-200.
- Churchward, G., Bremer, H. and Young, R. (1982) Macromolecular composition of bacteria. *J Theor Biol*, **94**, 651-70.
- Colloms, S.D., Sykora, P., Szatmari, G. and Sherratt, D.J. (1990) Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichia coli* *xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *Journal of Bacteriology*, **172**, 6973-80.
- Cooper, N.S., Brown, M.E. and Caulcott, C.A. (1987) A mathematical method for analysing plasmid stability in micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, **133**, 1871-80.
- Davidson, A.M., Dunn, A., Day, M.J. and Randerson, P.F. (1990) A nonlinear technique for the analysis of plasmid instability in micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, **136**, 59-64.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. and Ginsburg, H.S. (1990) *Microbiology*. J.B.Lippincott Company, New York.
- de Taxis du Poet, P., Dhulster, P., Barbotin, J.N. and Thomas, D. (1986) Plasmid inheritability and biomass production: comparison between free and immobilized cell cultures of *Escherichia coli* BZ18(pTG201) without selection pressure. *J Bacteriol*, **165**, 871-7.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 434-64.
- Demma, A. (2001) The Biological Cost of Antibiotic Resistance Plasmids in Natural Populations

- of *Escherichia coli*. *Biology department*. Emory University, Atlanta, p. 62.
- Donachie, W.D. (1968) Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature*, **219**, 1077-9.
- Duetz, W.A., Marques, S., Wind, B., Ramos, J.L. and van An del, J.G. (1996) Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 601-6.
- Duetz, W.A. and van An del, J.G. (1991) Stability of TOL plasmid pWW0 in *Pseudomonas putida* mt-2 under non- selective conditions in continuous culture. *J Gen Microbiol*, **137**, 1369-74.
- Duetz, W.A., Winson, M.K., van An del, J.G. and Williams, P.A. (1991) Mathematical analysis of catabolic function loss in a population of *Pseudomonas putida* mt-2 during non-limited growth on benzoate. *J Gen Microbiol*, **137**, 1363-8.
- Dunn, A., Davidson, A.M., Day, M.J. and Randerson, P.F. (1995) An analysis of the instability kinetics of plasmid pHSG415 during continuous culture of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **141**, 63-70.
- Dunn, P.L. and North, R.J. (1991) Resolution of primary murine listeriosis and acquired resistance to lethal secondary infection can be mediated predominantly by Thy-1+ CD4- CD8- cells. *Journal of Infectious Diseases*, **164**, 869-77.
- Dykhuisen, D.E. (1993) Chemostats used for studying natural selection and adaptive evolution. *Methods in Enzymology*, **224**, 613-631.
- Dykhuisen, D.E. and Hartl, D.L. (1983) Selection in chemostats. *Microbiol Rev*, **47**, 150-68.
- Egli, T., Lendenmann, U. and Snozzi, M. (1993) Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **63**, 289-98.
- Ehrenberg, M. (1996) Hypothesis: hypersensitive plasmid copy number control for ColE1. *Biophys J*, **70**, 135-45.
- Ehrenberg, M. and Kurland, C.G. (1984) Costs of accuracy determined by a maximal growth rate constraint. *Q Rev Biophys*, **17**, 45-82.
- Ehrenberg, M. and Sverredal, A. (1995) A model for copy number control of the plasmid R1. *J Mol Biol*, **246**, 472-85.
- Eliasson, A., Bernander, R., Dasgupta, S. and Nordstrom, K. (1992) Direct visualization of plasmid DNA in bacterial cells. *Mol Microbiol*, **6**, 165-70.
- Eliasson, A., Bernander, R. and Nordstrom, K. (1996) Random initiation of replication of

- plasmids P1 and F (oriS) when integrated into the Escherichia coli chromosome. *Mol Microbiol*, **20**, 1025-32.
- Engberg, B., Hjalmarsson, K. and Nordstrom, K. (1975) Inhibition of cell division in Escherichia coli K-12 by the R-factor R1 and copy mutants of R1. *J Bacteriol*, **124**, 633-40.
- Filonov, A.E., Duetz, W.A., Karpov, A.V., Gaiazov, R.R., Kosheleva, I.A., Breure, A.M., Filonova, I.F., van Andel, J.G. and Boronin, A.M. (1997) Competition of plasmid-bearing Pseudomonas putida strains catabolizing naphthalene via various pathways in chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, **48**, 493-8.
- Fisher, R.A. (1930) *The genetical theory of natural selection*. The Clarendon Press, Oxford.
- Fleming, G., Dawson, M.T. and Patching, J.W. (1988) The isolation of strains of Bacillus subtilis showing improved plasmid stability characteristics by means of selective chemostat culture. *J Gen Microbiol*, **134**, 2095-101.
- Fleming, G.T. and Patching, J.W. (1994) Plasmid instability in an industrial strain of Bacillus subtilis grown in chemostat culture. *J Ind Microbiol*, **13**, 106-11.
- Frenkel, L. and Bremer, H. (1986) Increased amplification of plasmids pBR322 and pBR327 by low concentrations of chloramphenicol. *DNA*, **5**, 539-44.
- Ganusov, V.V. and Bergstrom, C.T. (2001) How to measure bacterial fitness? *in prep*.
- Ganusov, V.V. and Brilkov, A.V. (2001) How to measure parameters of plasmid-bearing cells? *in prep*.
- Ganusov, V.V., Bril'kov, A.V. and Pechurkin, N.S. (2001) Population dynamics of bacterial plasmids. *Mathematical modelling*, **13**, 77-98.
- Godwin, D. and Slater, J.H. (1979) The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in Escherichia coli K12. *J Gen Microbiol*, **111**, 201-10.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, **177**, 4121-30.
- Hartl, D.L., Dykhuizen, D.E. and Dean, A.M. (1985) Limits of adaptation: the evolution of selective neutrality. *Genetics*, **111**, 655-74.
- Harvey, R.J., Marr, A.G. and Painter, P.R. (1967) Kinetics of growth of individual cells of Escherichia coli and Azotobacter agilis. *Journal of Bacteriology*, **93**, 605-17.
- Herbert, D., Phipps, P.J. and Tempest, D.W. (1965) The chemostat: design and instrumentation. *Lab Pract*, **14**, 1150-61.
- Hillen, W. and Berens, C. (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded

- tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 345-69.
- Hodgman, T.C., Griffiths, H. and Summers, D.K. (1998) Nucleoprotein architecture and ColE1 dimer resolution: a hypothesis. *Molecular Microbiology*, **29**, 545-58.
- Hsu, S.B., Luo, T.K. and Waltman, P. (1995) Competition between plasmid-bearing and plasmid-free organisms in a chemostat with an inhibitor. *J Math Biol*, **34**, 225-238.
- Imanaka, T. and Aiba, S. (1981) A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid. *Ann N Y Acad Sci*, **369**, 1-14.
- Imanaka, T., Tsunekawa, H. and Aiba, S. (1980) Phenotypic stability of trp operon recombinant plasmids in Escherichia coli. *J Gen Microbiol*, **118**, 253-61.
- Impoolsup, A., Caunt, P. and Greenfield, P.F. (1989) Effect of growth rate on stability of a recombinant plasmid during continuous culture of Saccharomyces cerevisiae in non-selective medium. *J Biotechnol*, **10**, 171-180.
- Jones, I.M., Primrose, S.B., Robinson, A. and Ellwood, D.C. (1980) Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture. *Mol Gen Genet*, **180**, 579-84.
- Jons, A. and Mettenleiter, T.C. (1997) Green fluorescent protein expressed by recombinant pseudorabies virus as an in vivo marker for viral replication. *J Virol Methods*, **66**, 283-92.
- Kampen, N.G.v. (1981) *Stochastic processes in physics and chemistry*. North-Holland ; sole distributors for the USA and Canada Elsevier North-Holland, Amsterdam ; New York.
- Keasling, J.D., Kuo, H. and Vahanian, G. (1995) A Monte Carlo simulation of the Escherichia coli cell cycle. *J Theor Biol*, **176**, 411-30.
- Keasling, J.D. and Palsson, B.O. (1989) ColE1 plasmid replication: a simple kinetic description from a structured model. *J Theor Biol*, **141**, 447-61.
- Keevil, C.W., Spillane, B.J. and Major, N.C. (1987) Plasmid stability and antibiotic resistance of Neisseria gonorrhoea during glucose-limited continuous culture. *J Med Microbiol*, **24**, 351-7.
- Khan, S.A. (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 442-55.
- Kleinman, M.J., Stanbury, P.F. and Gingold, E.B. (1986) The stability of the yeast plasmid pJDB248 depends on the growth rate of the culture. *Biotechnology letters*, **8**, 225-230.
- Kubitschek, H.E. (1986) Increase in cell mass during the division cycle of Escherichia coli B/rA. *J Bacteriol*, **168**, 613-8.
- Kumar, P.K., Maschke, H.E., Friehs, K. and Schugerl, K. (1991) Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. *Trends Biotechnol*, **9**,

- 279-84.
- Lederberg, J. (1998) Plasmid (1952-1997). *Plasmid*, **39**, 1-9.
- Lee, J.H. and Lee, K.J. (1994) Effect of growth rate and cultivation environments on cloned gene stability and the cloned gene product formation in *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol*, **33**, 195-204.
- Lee, S.B. and Bailey, J.E. (1984a) A mathematical model for lambda dv plasmid replication: analysis of copy number mutants. *Plasmid*, **11**, 166-77.
- Lee, S.B. and Bailey, J.E. (1984b) A mathematical model for lambda dv plasmid replication: analysis of wild-type plasmid. *Plasmid*, **11**, 151-65.
- Lee, S.B. and Bailey, J.E. (2000) Analysis of growth rate effects on productivity of recombinant *Escherichia coli* populations using molecular mechanism models. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 26, Issue 1, Pages 66-73 (1984) [classical article]. *Biotechnol Bioeng*, **67**, 805-12.
- Lee, S.W. and Edlin, G. (1985) Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene*, **39**, 173-80.
- Leff, L.G. and Leff, A.A. (1996) Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 3486-8.
- Leipold, R.J., Krewson, C.E. and Dhurjati, P. (1994) Mathematical model of temperature-sensitive plasmid replication. *Plasmid*, **32**, 131-67.
- Lendenmann, U. and Egli, T. (1995) Is *Escherichia coli* growing in glucose-limited chemostat culture able to utilize other sugars without lag? *Microbiology*, **141**, 71-8.
- Lendenmann, U., Snozzi, M. and Egli, T. (1996) Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 1493-9.
- Lendenmann, U., Snozzi, M. and Egli, T. (2000) Growth kinetics of *Escherichia coli* with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture. *Can J Microbiol*, **46**, 72-80.
- Lenski, R.E. (1991) Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology*, **15**, 173-92.
- Lenski, R.E. (1993) Evaluating the fate of genetically modified microorganisms in the environment: are they inherently less fit? *Experientia*, **49**, 201-9.
- Lenski, R.E. and Bouma, J.E. (1987) Effects of segregation and selection on instability of

- plasmid pACYC184 in *Escherichia coli* B. *J Bacteriol*, **169**, 5314-6.
- Lenski, R.E. and Hattingh, S.E. (1986) Coexistence of two competitors on one resource and one inhibitor: a chemostat model based on bacteria and antibiotics. *J Theor Biol*, **122**, 83-93.
- Lenski, R.E., Mongold, J.A., Sniegowski, P.D., Travisano, M., Vasi, F., Gerrish, P.J. and Schmidt, T.M. (1998) Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: what makes one genotype a better competitor than another? *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 35-47.
- Lenski, R.E., Simpson, S.C. and Nguyen, T.T. (1994a) Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *J Bacteriol*, **176**, 3140-7.
- Lenski, R.E., Souza, V., Duong, L.P., Phan, Q.G., Nguyen, T.N. and Bertrand, K.P. (1994b) Epistatic effects of promoter and repressor functions of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli*. *Mol Ecol*, **3**, 127-35.
- Lenski, R.E. and Travisano, M. (1994) Dynamics of adaptation and diversification: A 10,000 generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **91**, 6808-6914.
- Levin, B.R. (1972) Coexistence of two asexual strains on a single resource. *Science*, **175**, 1272-1274.
- Levin, B.R., Perrot, V. and Walker, N. (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, **154**, 985-97.
- Levin, B.R. and Rice, V.A. (1980) The kinetics of transfer of nonconjugative plasmids by mobilizing conjugative factors. *Genetical Research*, **35**, 241-59.
- Levin, B.R. and Stewart, F.M. (1977) Probability of establishing chimeric plasmids in natural populations of bacteria. *Science*, **196**, 218-20.
- Levin, B.R. and Stewart, F.M. (1980) The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of mobilizable nonconjugative factors. *Genetics*, **94**, 425-43.
- Levin, B.R., Stewart, F.M. and Rice, V.A. (1979) The kinetics of conjugative plasmid transmission: fit of a simple mass action model. *Plasmid*, **2**, 247-60.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C. and Kain, S.R. (1998) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, **273**, 34970-5.
- Lin-Chao, S. and Bremer, H. (1986) Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, **203**, 143-9.
- Lin-Chao, S. and Bremer, H. (1987) Activities of the RNAI and RNAII promoters of plasmid

- pBR322. *Journal of Bacteriology*, **169**, 1217-22.
- Lin-Chao, S. and Cohen, S.N. (1991) The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell*, **65**, 1233-42.
- Lobner-Olesen, A. (1999) Distribution of minichromosomes in individual *Escherichia coli* cells: implications for replication control. *EMBO Journal*, **18**, 1712-21.
- Lu, Z. and Haderl, K.P. (1998) Model of plasmid-bearing, plasmid-free competition in the chemostat with nutrient recycling and an inhibitor. *Math Biosciences*, **148**, 147-159.
- Marr, A.G. (1991) Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, **55**, 316-33.
- Masukata, H. and Tomizawa, J. (1986) Control of primer formation for ColE1 plasmid replication: conformational change of the primer transcript. *Cell*, **44**, 125-36.
- May, R.M. and Nowak, M.A. (1994) Superinfection, metapopulation dynamics and the evolution of diversity. *Journal of Theoretical Biology*, **170**, 95-114.
- May, R.M. and Nowak, M.A. (1995) Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B*, **261**, 209-215.
- McDermott, P.J., Gowland, P. and Gowland, P.C. (1993) Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322. *Letters in Applied Microbiology*, **17**, 139-43.
- Meacock, P.A. and Cohen, S.N. (1980) Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell*, **20**, 529-42.
- Melling, J., Ellwood, D.L. and Robinson, A. (1977) Survival of R-factors carrying *E.coli* in mixed cultures in chemostat. *FEMS lett*, **2**, 87-89.
- Mongold, J.A. (1992) Theoretical implications for the evolution of postsegregational killing by bacteria plasmids. *Am Nat*, **139**, 677-689.
- Monod, J. (1949) The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, **3**, 371-394.
- Monod, J. (1950) La technique de culture continue. Theorie et applications. *Ann Inst Past*, **79**, 390-410.
- Morita, M. and Oka, A. (1979) The structure of a transcriptional unit on colicin E1 plasmid. *Eur J Biochem*, **97**, 435-43.
- Moser, H. (1958) *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat*. Carnegie institution of Washington, [Washington].
- Neidhardt, F.C. and Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Nguyen, T.N., Phan, Q.G., Duong, L.P., Bertrand, K.P. and Lenski, R.E. (1989) Effects of carriage and expression of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of

- Escherichia coli K12. *Mol Biol Evol*, **6**, 213-25.
- Noack, D., Roth, M., Geuther, R., Muller, G., Undisz, K., Hoffmeier, C. and Gaspar, S. (1981) Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in Escherichia coli K12 strains grown in a chemostat. *Mol Gen Genet*, **184**, 121-4.
- Nordstrom, K. (1983) Replication of plasmid R1: Meselson-Stahl density shift experiments revisited. *Plasmid*, **9**, 218-21.
- Nordstrom, K. (1984) Equipartition and other modes of partition: on the interpretation of curing kinetics using rep(ts) plasmids. *Mol Gen Genet*, **198**, 185-6.
- Nordstrom, K. (1985) Control of plasmid replication: theoretical considerations and practical solutions. *Basic Life Sci*, **30**, 189-214.
- Nordstrom, K. and Aagaard-Hansen, H. (1984) Maintenance of bacterial plasmids: comparison of theoretical calculations and experiments with plasmid R1 in Escherichia coli. *Mol Gen Genet*, **197**, 1-7.
- Nordstrom, K. and Austin, S.J. (1989) Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu Rev Genet*, **23**, 37-69.
- Nordstrom, K., Molin, S. and Aagaard-Hansen, H. (1980a) Partitioning of plasmid R1 in Escherichia coli. I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted of the par region. *Plasmid*, **4**, 215-27.
- Nordstrom, K., Molin, S. and Aagaard-Hansen, H. (1980b) Partitioning of plasmid R1 in Escherichia coli. II. Incompatibility properties of the partitioning system. *Plasmid*, **4**, 332-9.
- Nordstrom, K., Molin, S. and Light, J. (1984) Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid*, **12**, 71-90.
- Nordstrom, K. and Wagner, E.G. (1994) Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem Sci*, **19**, 294-300.
- Novick, A. and Szilard, L. (1950) Description of the chemostat. *Science*, **112**, 715-718.
- O'Kennedy, R.D. and Patching, J.W. (1997) Effects of medium composition and nutrient limitation on loss of the recombinant plasmid pLG669-z and beta-galactosidase expression by Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **18**, 319-25.
- Papadopoulos, D., Schneider, D., Meier-Eiss, J., Arber, W., Lenski, R.E. and Blot, M. (1999) Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A*, **96**, 3807-12.
- Paulsson, J. and Ehrenberg, M. (1998) Trade-off between segregational stability and metabolic burden: a mathematical model of plasmid ColE1 replication control. *J Mol Biol*, **279**, 73-88.
- Paulsson, J. and Ehrenberg, M. (2000) Molecular clocks reduce plasmid loss rates: the R1 case. *J Mol Biol*, **297**, 179-92.
- Paulsson, J., Nordstrom, K. and Ehrenberg, M. (1998) Requirements for rapid plasmid ColE1 copy number adjustments: a mathematical model of inhibition modes and RNA turnover rates. *Plasmid*, **39**, 215-34.
- Perelson, A.S. and Brendel, V. (1989) Kinetics of complementary RNA-RNA interaction involved in plasmid ColE1 copy number control. *J Mol Biol*, **208**, 245-55.
- Peretti, S.W. and Bailey, J.E. (1987) Simulation of plasmid-host interaction in Escherichia coli: Copy number, promoter strength, and ribosome binding site strength effect on metabolic activity and plasmid gene expression. *Biotechnol Bioeng*, **29**, 316-328.
- Persson, C., Wagner, E.G. and Nordstrom, K. (1990a) Control of replication of plasmid R1: formation of an initial transient complex is rate-limiting for antisense RNA--target RNA pairing. *Embo J*, **9**, 3777-85.
- Persson, C., Wagner, E.G. and Nordstrom, K. (1990b) Control of replication of plasmid R1: structures and sequences of the antisense RNA, CopA, required for its binding to the target RNA, CopT. *Embo J*, **9**, 3767-75.
- Pirt, S.J. (1975) *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific publications, Oxford.
- Proctor, G.N. (1994) Mathematics of microbial plasmid instability and subsequent differential growth of plasmid-free and plasmid-containing cells, relevant to the analysis of experimental colony number data. *Plasmid*, **32**, 101-30.
- Ramesh, A., Panda, A.K., Maiti, B.R. and Mukhopadhyay, A. (1995) Studies on plasmid stability and LTB production by recombinant *Vibrio cholerae* in batch and chemostat cultures: a lesson for optimizing conditions for chemical induction. *J Biotechnol*, **43**, 45-51.
- Rasooly, A. and Rasooly, R.S. (1997) How rolling circle plasmids control their copy number. *Trends Microbiol*, **5**, 440-6.
- Reynolds, M.G. (2000) Compensatory evolution in rifampin-resistant escherichia coli. *Genetics*, **156**, 1471-81.
- Rosenfeld, R. and Grover, N.B. (1993a) Control of mini-R1 plasmid replication: a computer

- simulation. *Plasmid*, **29**, 94-116.
- Rosenfeld, R. and Grover, N.B. (1993b) Partition of plasmid R1 A computer simulation. *Plasmid*, **29**, 117-124.
- Sayadi, S., Nasri, M., Berry, F., Barbotin, J.N. and Thomas, D. (1987) Effect of temperature on the stability of plasmid pTG201 and productivity of xylE gene product in recombinant *Escherichia coli*: development of a two-stage chemostat with free and immobilized cells. *J Gen Microbiol*, **133**, 1901-8.
- Seegers, J.F., Franke, C.M., Kiewiet, R., Venema, G. and Bron, S. (1995) Use of continuous culture for the selection of plasmids with improved segregational stability. *Plasmid*, **33**, 71-7.
- Seo, K.H. and Bailey, J.E. (1985) A segregated model for plasmid content and product synthesis in unstable binary fission recombinant organisms. *Biotechnol Bioeng*, **27**, 156-165.
- Siegele, D.A. and Hu, J.C. (1997) Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8168-72.
- Smith, H.L. and Waltman, P.E. (1995) *The theory of the chemostat : dynamics of microbial competition*. Cambridge University Press, Cambridge ; New York, NY.
- Smith, J.A. and Martin, L. (1973) Do cells cycle? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 1263-7.
- Smith, M.A. and Bidochka, M.J. (1998) Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 351-5.
- Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J. and Lenski, R.E. (1997) Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E.coli*. *Nature*, **387**, 703-705.
- Sobecky, P.A., Schell, M.A., Moran, M.A. and Hodson, R.E. (1992) Adaptation of model genetically engineered microorganisms to lake water: growth rate enhancements and plasmid loss. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 3630-7.
- Srienc, F., Campbell, J.L. and Bailey, J.E. (1986) Flow cytometry analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* populations. *Cytometry*, **7**, 132-41.
- Sterkenburg, A., Van Leeuwen, P. and Wouters, J.T. (1988) Loss of phage resistance encoded by plasmid pSK112 in chemostat cultures of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK110. *Biochimie*, **70**, 451-6.
- Stewart, F.M. and Levin, B.R. (1977) The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*, **87**, 209-228.

- Stueber, D. and Bujard, H. (1982) Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *Embo J*, **1**, 1399-404.
- Summers, D. (1998) Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol Microbiol*, **29**, 1137-45.
- Summers, D., Yaish, S., Archer, J. and Sherratt, D. (1985) Multimer resolution systems of ColE1 and ColK: localisation of the crossover site. *Mol Gen Genet*, **201**, 334-8.
- Summers, D.K. (1991) The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnol*, **9**, 273-8.
- Summers, D.K. (1993) Stability of genetic material in prokaryotes. *Biologicals*, **21**, 91-3.
- Summers, D.K. (1994) The origins and consequences of genetic instability in prokaryotes. *Dev Biol Stand*, **83**, 7-11.
- Summers, D.K. (1996) *The biology of plasmids*. Blackwell science,, Cambridge, MA.
- Summers, D.K., Beton, C.W. and Withers, H.L. (1993) Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol*, **8**, 1031-8.
- Summers, D.K. and Sherratt, D.J. (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, **36**, 1097-103.
- Thomas, C.M. (1988) Recent studies on the control of plasmid replication. *Biochim Biophys Acta*, **949**, 253-63.
- Tolker-Nielsen, T. and Boe, L. (1994) A statistical analysis of the formation of plasmid-free cells in populations of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **176**, 4306-10.
- Tomizawa, J. (1984) Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell*, **38**, 861-70.
- Tomizawa, J. (1985) Control of ColE1 plasmid replication: initial interaction of RNA I and the primer transcript is reversible. *Cell*, **40**, 527-35.
- Tomizawa, J. (1986) Control of ColE1 plasmid replication: binding of RNA I to RNA II and inhibition of primer formation. *Cell*, **47**, 89-97.
- Tomizawa, J. (1990a) Control of ColE1 plasmid replication. Interaction of Rom protein with an unstable complex formed by RNA I and RNA II. *J Mol Biol*, **212**, 695-708.
- Tomizawa, J. (1990b) Control of ColE1 plasmid replication. Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J Mol Biol*, **212**, 683-94.
- Tomizawa, J. and Itoh, T. (1981) Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6096-100.

- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. and Som, T. (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1421-5.
- Tomizawa, J. and Som, T. (1984) Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell*, **38**, 871-8.
- Tseng, W.C., Haselton, F.R. and Giorgio, T.D. (1997) Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem*, **272**, 25641-7.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-44.
- Tyson, J.J. (1989) Effects of asymmetric division on a stochastic model of the cell division cycle. *Math Biosci*, **96**, 165-84.
- Tyson, J.J. (1991) Modeling the cell division cycle: cdc2 and cyclin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7328-32.
- Tyson, J.J. and Diekmann, O. (1986) Sloppy size control of the cell division cycle. *J Theor Biol*, **118**, 405-26.
- Tyson, J.J. and Hannsgen, K.B. (1985a) The distributions of cell size and generation time in a model of the cell cycle incorporating size control and random transitions. *J Theor Biol*, **113**, 29-62.
- Tyson, J.J. and Hannsgen, K.B. (1985b) Global asymptotic stability of the size distribution in probabilistic models of the cell cycle. *J Math Biol*, **22**, 61-8.
- Tyson, J.J. and Hannsgen, K.B. (1986) Cell growth and division: a deterministic/probabilistic model of the cell cycle. *J Math Biol*, **23**, 231-46.
- Uhlen, B.E. and Nordstrom, K. (1977) R plasmid gene dosage effects in Escherichia coli K-12: copy mutants of the R plasmid R1drd-19. *Plasmid*, **1**, 1-7.
- Vernet, T., McDonald, I.J., Cameron, D.R. and Visentin, L.P. (1985) Stable maintenance in chemostat-grown Escherichia coli of pBR322 and pACYC184 by disruption of the tetracycline resistance gene. *Biosci Rep*, **5**, 29-37.
- Walmsley, R.M., Gardner, D.C. and Oliver, S.G. (1983) Stability of a cloned gene in yeast grown in chemostat culture. *Mol Gen Genet*, **192**, 361-5.
- Weikert, C., Sauer, U. and Bailey, J.E. (1997) Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of Escherichia coli mutants with improved physiological properties. *Microbiology*, **143**, 1567-74.
- Williams, D.R. and Thomas, C.M. (1992) Active partitioning of bacterial plasmids. *J Gen Microbiol*, **138**, 1-16.

- Williams, P.A., Taylor, S.D. and Gibb, L.E. (1988) Loss of the toluene-xylene catabolic genes of TOL plasmid pWW0 during growth of *Pseudomonas putida* on benzoate is due to a selective growth advantage of 'cured' segregants. *J Gen Microbiol*, **134**, 2039-48.
- Wilson, T. and Hastings, J.W. (1998) Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 197-230.
- Wittrup, K.D. and Bailey, J.E. (1988) A mathematical model of recombinational amplification of the 2 μ plasmid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Theoretical Biology*, **130**, 481-92.
- Wolfram, S. (1990) *Mathematica : a system for doing mathematics by computer*. Addison-Wesley Pub. co., Redwood City, Calif.
- Wong, P., Gladney, S. and Keasling, J.D. (1997) Mathematical model of the lac operon: inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechnol Prog*, **13**, 132-43.
- Wouters, J.T., Driehuis, F.L., Polaczek, P.J., van Oppenraay, M.L. and van Andel, J.G. (1980) Persistence of the pBR 322 plasmid in *Escherichia coli* K 12 grown in chemostat cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **46**, 353-62.
- Wouters, J.T. and van Andel, J.G. (1979) R-plasmid persistence in *Escherichia coli* grown in chemostat cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **45**, 317-8.
- Wouters, J.T.M. and van Andel, J.G. (1983) Persistence of the R6 plasmid in *Escherichia coli* grown in chemostat cultures. *FEMS Microbiol Lett*, **16**, 169-174.
- Zund, P. and Lebek, G. (1980) Generation time-prolonging R plasmids: correlation between increases in the generation time of *Escherichia coli* caused by R plasmids and their molecular size. *Plasmid*, **3**, 65-9.